



Faculteit Farmaceutische Wetenschappen

Vakgroep Farmaceutische Analyse

Laboratorium voor Farmaceutische Microbiologie

IN VITRO STUDIE VAN *CANDIDA ALBICANS* EN *STREPTOCOCCUS MUTANS* BIOFILMS

Apr. Kris Honraet

Proefschrift voorgedragen tot het bekomen van de graad van

Doctor in de Farmaceutische Wetenschappen

2005

Promotor

Prof. Dr. Apr. H.J. Nelis

De auteur en de promotor geven de toelating dit proefschrift voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit dit proefschrift.

Gent, november 2005

De auteur,

De promotor,

Apr. Kris Honraet

Prof. Dr. Apr. H.J. Nelis

Dankwoord

Een doctoraat is nooit de verwezenlijking van één persoon. Enkel door de steun en praktische hulp van heel wat mensen is dit werk tot stand kunnen komen.

In eerste instantie is er mijn promotor, prof. Nelis, die ik wil bedanken voor het vertrouwen in mij en om me de mogelijkheid te bieden een doctoraatsstudie aan te vangen. Zonder uw brede kennis, kritische ingesteldheid en vlotte pen zou dit werk er niet zijn. Ook de voorliefde voor Macintosh heb ik aan u te danken. Karen, Tjene en Eva, bedankt voor de interessante wetenschappelijke discussies en aangename onderonsjes. Ook mijn andere collega's, Petra, Pascale, Marleen en Ils, hebben de tijd die ik in het labo heb doorgebracht onvergetelijk gemaakt. Julien, jij bent bij het praktisch werk een onontbeerlijke steun geweest. Claudine en Rosina, jullie hebben me steeds met raad en daad bijgestaan in de toch wel erg veel administratieve kanten van een doctoraat. Heleen en Tom, ook met jullie heb ik leuke tijden beleefd. Naast de snelle vooruitgang voor mijn onderzoek, hebben mijn stagiairs, Sabien, Sofie, Ann, Kelly, Eveline, Susannah en Lies, gezorgd voor een aangename afwisseling en een soms frisse blik op problemen.

Nele en Kristof, jullie wil en moet ik apart vermelden. Wij drieën zijn in de laatste periode uitgegroeid tot de drie musketiers van het labo en het plezier dat wij hebben beleefd, zeker ten tijde van "gummy", zal ik nooit vergeten. Muriel, mijn kantoorgenoot en partner in soms wilde opkuis-acties, wil ik speciaal bedanken. Haar steun op zowel persoonlijk als op wetenschappelijk vlak valt niet in woorden te omschrijven. Ik zal vooral de tijden wanneer jij je onderste bureau-lade uittrok niet vergeten.

Naast de mensen van het labo, zijn de samenwerkingen met anderen enorm belangrijk geweest. Prof. Vermeersch u moet ik beschouwen als één van de vaders van mijn project. Daarnaast hebben de professoren Remon en Vervaeke in het beginstadium van de ontwikkeling van "vermengd" polysiloxaan een belangrijke rol gespeeld. Prof. Schacht en Nele De Smet wil ik bedanken voor de leuke samenwerking en de praktische ondersteuning bij het impregneren van het polysiloxaan. Tenslotte wens ik nog dr. Summerbell, prof. Vandenbossche en prof. Demeester te bedanken voor hun hulp en uitleg bij diverse problemen die tijdens mijn doctoraat rezen.

Statistiek is een beetje de hel van iedere onderzoeker, maar gelukkig heb ik het genoeg gehad om met diverse experts, zoals Prof. Ysebaert, Prof. Goetghebeur, Prof. Thas en Prof. Thienpont, te kunnen samenwerken. Zonder hun inzicht, uitleg, ideeën en vooral geduld zou de statistische onderbouwing van dit werk niet mogelijk zijn geweest.

Walter en zeker Herman (Helvoet Pharma) wens ik te bedanken voor de hulp bij het vervaardigen van het vernet polysiloxaan. Ook de mensen van de Centrale Werkplaats van de Universiteit Gent, Firmin, Mario..., hebben een belangrijke bijdrage geleverd voor dit werk. Bart (Oystershell N.V.), de geestelijke vader van het onderzoek op tandplak, jij was voor mij als het ware een tweede promotor. De uren die wij hebben gediscussieerd, hebben enorm bijgedragen tot de uitdieping van mijn onderzoek. Dit werk kon ook niet worden gerealiseerd zonder de financiële steun van de Belgische Federatie tegen Kanker, het IWT en Oystershell N.V.

Tenslotte wil ik mijn ouders bedanken, die mij doorheen alles hebben gesteund. Mijn zus en vrienden die altijd klaarstonden met raad en daad om de druk soms van de ketel te laten. Als laatste is er nog Isabelle, die tijdens mijn doctoraat mijn vrouw is willen worden. Wat zij heeft doorstaan de voorbije jaren, maar vooral de laatste maanden is onbeschrijfelijk. Het geduldig luisteren naar weeral hetzelfde verhaal en telkens weer optimistisch met nieuwe oplossingen op de proppen komen, is iets waar ik alleen maar bewondering voor kan hebben.

Tot slot wil ik iedereen, die hier niet staat vermeld, bedanken. Jullie zijn niet vergeten.

Kris

ALGEMENE INLEIDING OVER BIOFILMS	1
1. KORTE HISTORIEK	1
2. ALGEMENE PRINCIPES EN DEFINITIES	2
2.1. BIOFILM: DEFINITIE	2
2.2. BIOFILMVORMING	3
2.3. COMPONENTEN IN EEN BIOFILM	5
2.3.1. Oppervlak	5
2.3.2. Micro-organismen	6
2.3.3. Matrix	8
2.4. RESISTENTIE	9
3. PROBLEMATIEK VAN BIOFILMS	11
3.1. BESCHADIGING VAN HET GEKOLONISEERDE OPPERVLAKE	11
3.2. PERSISTENTE INFECTIEHAARD	12
4. PREVENTIE EN ERADICATIE VAN BIOFILMS	13
4.1. OPPERVLAKE	13
4.2. MICRO-ORGANISMEN	14
4.3. MATRIX	15
DEEL 1: CANDIDA SPECIES BIOFILMS OP SPRAAKPROTHESEN	17
1. ACHTERGROND	17
1.1. SPRAAKPROTHESEN	17
1.1.1. Laryngectomie	17
1.1.2. Spraakprothese	18
1.1.3. Problemen met de TSP	19
1.2. CANDIDA	20
1.2.1. Taxonomie en eigenschappen	20
1.2.2. Susceptibiliteit van <i>Candida</i> spp. aan antimycotica	21
1.2.2.1. Antimycotica	21
1.2.2.2. Resistentie	23
1.2.2.3. Susceptibiliteitstesten	24
1.2.3. Kwantificatie van gistcellen	25
1.2.3.1. Plaatgietmethode	25
1.2.3.2. Bepaling van een metabole activiteit	26
1.2.3.3. Binding van een kleurstof/fluorochroom op een cellulair element	27
1.3. <i>C. ALBICANS</i> BIOFILMS	28
1.3.1. Ontwikkeling en architectuur van <i>C. albicans</i> biofilms	28
1.3.2. In vitro systemen voor de groei/kwantificatie van <i>C. albicans</i> biofilms	28
1.3.3. <i>Candida</i> spp. biofilms op spraakprothesen	29
1.4. PREVENTIE VAN GISTBIOFILMS OP SPRAAKPROTHESEN	30
1.4.1. Bestaande preventieve strategieën	30

1.4.2. Nieuwe preventieve strategieën	30
2. SPECIFIEKE OBJECTIEVEN	33
3. VÓORKOMEN EN SUSCEPTIBILITEIT VAN GISTEN OP TSPn	35
3.1. ISOLATIE EN IDENTIFICATIE VAN GISTEN AFKOMSTIG VAN TSPn	35
3.1.1. Principe	35
3.1.2. Materialen en methoden	35
3.1.2.1. Klinische monsters	35
3.1.2.2. Isolatie	35
3.1.2.3. Identificatie	36
3.1.3. Resultaten	38
3.1.3.1. Opzuivering van de gegevens	38
3.1.3.2. Speciesfrequentie	39
3.1.3.3. Frequentie van het aantal species	40
3.1.4. Bespreking.....	41
3.1.5. Besluit	42
3.2. SUSCEPTIBILITEIT VAN TSP ISOLATEN	43
3.2.1. Principe	43
3.2.2. Materialen en methoden	43
3.2.2.1. Isolaten	43
3.2.2.2. Antimycotica	43
3.2.2.3. Groeimedia	44
3.2.2.4. Microtiterplaten	44
3.2.2.5. Procedures	45
3.2.3. Resultaten	47
3.2.4. Bespreking.....	50
3.2.5. Besluit	50
4. SYSTEMEN VOOR IN VITRO BIOFILMVORMING DOOR <i>C. ALBICANS</i>	51
4.1. KWANTIFICATIE VAN PLANKTONISCHE CELLEN	51
4.1.1. Principe	51
4.1.2. Materialen en methoden	51
4.1.2.1. Isolaten	51
4.1.2.2. Kwantificatietechnieken.....	52
4.1.2.3. Statistische analyse.....	53
4.1.3. Resultaten	54
4.1.3.1. Het XTT-assay	54
4.1.3.2. Het FDA-assay	54
4.1.3.3. Het SYTO [®] 9-assay.....	55
4.1.4. Bespreking.....	56
4.2. EVALUATIE VAN 3 IN VITRO BIOFILMSYSTEMEN	57
4.2.1. Principe	57
4.2.2. Materialen en methoden	57
4.2.2.1. Stam	57
4.2.2.2. Groeimedia	57
4.2.2.3. Siliconenschijfjes	57

4.2.2.4. Modelsystemen	59
4.2.2.5. Evaluatie van de biofilmvorming	64
4.2.2.6. Statistische analyse	65
4.2.3. Resultaten	65
4.2.3.1. Het statisch systeem	65
4.2.3.2. De MRDs	66
4.2.3.3. De CDC reactor	66
4.2.3.4. Vergelijking van de drie biofilmsystemen	67
4.2.4. Bespreking.....	67
4.2.5. Besluit.....	68
4.3. KWANTIFICATIE VAN GISTBIOFILMS	69
4.3.1. Principe	69
4.3.2. Materialen en methoden	69
4.3.2.1. Biofilmsysteem.....	69
4.3.2.2. Kwantificatietechnieken	69
4.3.2.3. Statistische analyse	71
4.3.3. Resultaten	71
4.3.4. Bespreking.....	72
4.3.5. Besluit.....	73
5. PREVENTIE VAN GISTBIOFILMVORMING: ANTIMYCOTISCHE SILICONEN.....	75
5.1. PRINCIPES.....	75
5.2. MATERIALEN EN METHODEN	75
5.2.1. Bereiding van de antimycotische siliconen	75
5.2.1.1. “Vermengd” polysiloxaan.....	75
5.2.1.2. Geïmpregneerd polysiloxaan	76
5.2.2. Vrijstelling van het nystatine	77
5.2.3. Antimycotisch effect van met nystatine opgeladen polysiloxaan	78
5.2.4. Evaluatie van het antibiofilm effect van “vermengd” polysiloxaan	78
5.2.4.1. Het statisch biofilmsysteem.....	78
5.2.4.2. De MRDs	79
5.2.4.3. De CDC biofilmreactor	79
5.2.4.4. Statistische analyse	79
5.3. RESULTATEN	80
5.3.1. Rheologische gegevens	80
5.3.2. Vrijstelling van het nystatine	81
5.3.3. Antimycotisch effect van met nystatine opgeladen polysiloxaan	82
5.3.4. Evaluatie van het antibiofilm effect van “vermengd” polysiloxaan	83
5.3.4.1. Het statisch systeem	83
5.3.4.2. De MRDs	84
5.3.4.3. De CDC biofilmreactor	85
5.4. BESPREKING	86
5.5. BESLUIT	88
6. BESLUITEN	89

DEEL 2: STREPTOCOCCUS MUTANS BIOFILMS - TANDPLAK	91
1. ACHTERGROND	91
1.1. TANDPLAK	91
1.1.1. Definitie	91
1.1.2. Vorming van tandplak	91
1.1.3. Tandplak-gerelateerde problemen	93
1.2. STREPTOCOCCUS MUTANS	94
1.2.1. Taxonomie en eigenschappen	94
1.2.2. Kwantificatie van <i>S. mutans</i>	94
1.2.2.1. Propidiumjodide	95
1.2.2.2. SYTOX [®] Green	95
1.3. <i>S. MUTANS</i> BIOFILMS	95
1.3.1. Situering van <i>S. mutans</i> binnen de context van tandplak	95
1.3.2. In vitro systemen voor de groei van orale biofilms	96
1.4. AANPAK VAN TANDPLAK	96
1.4.1. Preventie van tandplak	96
1.4.1.1. Beperking van sucrose-inname	96
1.4.1.2. Sucrozevervangende zoetstoffen	97
1.4.1.3. GTF-remming	97
1.4.2. Behandeling van tandplak	98
1.4.2.1. Mechanische verwijdering van tandplak	98
1.4.2.2. Chemische bestrijding	98
2. SPECIFIEKE OBJECTIEVEN	101
3. SYSTEMEN VOOR IN VITRO BIOFILMGROEI DOOR <i>S. MUTANS</i>	103
3.1. KWANTIFICATIE VAN PLANKTONISCHE CELLEN	103
3.1.1. Principe	103
3.1.2. Materialen en methoden	103
3.1.2.1. Verdunningsreeksen	103
3.1.2.2. Kwantificatietechnieken	104
3.1.2.3. Statistische analyse	105
3.1.3. Resultaten	105
3.1.3.1. Het FDA-assay	105
3.1.3.2. Het SYTO [®] 9-assay	106
3.1.3.3. Het PI-assay	107
3.1.3.4. SYTOX [®] Green-assay	107
3.1.4. Bespreking	108
3.1.5. Besluit	108
3.2. EVALUATIE VAN 3 IN VITRO BIOFILMSYSTEMEN	109
3.2.1. Principe	109
3.2.2. Materialen en methoden	109
3.2.2.1. Schijfjes, stam en media	109
3.2.2.2. Statisch systeem	109
3.2.2.3. De MRDs	111

3.2.2.4. De CDC biofilmreactor	113
3.2.2.5. Kwantificatie van de biomassa.....	114
3.2.2.6. Statistische analyse.....	115
3.2.3. Resultaten	115
3.2.3.1. Statisch systeem.....	115
3.2.3.2. De MRDs.....	117
3.2.3.3. De CDC biofilmreactor	118
3.2.4. Bespreking.....	119
3.2.4.1. Het statisch systeem	119
3.2.4.2. De MRDs.....	120
3.2.4.3. De CDC biofilmreactor	121
3.2.5. Besluit.....	121
4. GTF-INHIBITIE ASSAYS	123
4.1. PRINCIPE	123
4.2. MATERIALEN EN METHODEN	123
4.2.1. De GTF-inhibitoren	123
4.2.2. GTF	124
4.2.3. Het PNPG-assay.....	124
4.2.4. Het dextraanassay.....	124
4.3. RESULTATEN	125
4.3.1. Het PNPG-assay.....	125
4.3.2. Het dextraanassay.....	126
4.4. BESPREKING	127
4.4.1. Het PNPG-assay.....	127
4.4.2. Het dextraanassay.....	128
5. REMMING VAN DE <i>S. MUTANS</i> BIOFILMVORMING DOOR PE	131
5.1. PRINCIPES.....	131
5.2. MATERIALEN EN METHODEN	131
5.2.1. De plantenextracten	131
5.2.2. Antibacterieel effect van de PE	132
5.2.3. Controle van de microbiële contaminatie van de PE.....	133
5.2.4. Evaluatie van de remming van de <i>S. mutans</i> biofilmvorming door PE	133
5.2.5. Bepaling van de inhibitie van het GTF door de PE	134
5.2.6. Statistische evaluatie	134
5.3. RESULTATEN	135
5.3.1. Antibacteriële activiteit en microbiële contaminatie van de PE.....	135
5.3.2. Studie van de remming van de <i>S. mutans</i> biofilmvorming door PE	135
5.3.3. Bepaling van de inhibitie van GTF door de PE	136
5.4. BESPREKING	137
6. BESLUITEN	141
ALGEMENE CONCLUSIES	143
SAMENVATTING – SUMMARY	145

1. SAMENVATTING	145
2. SUMMARY	149
REFERENTIES	153

lijst van de gebruikte afkortingen

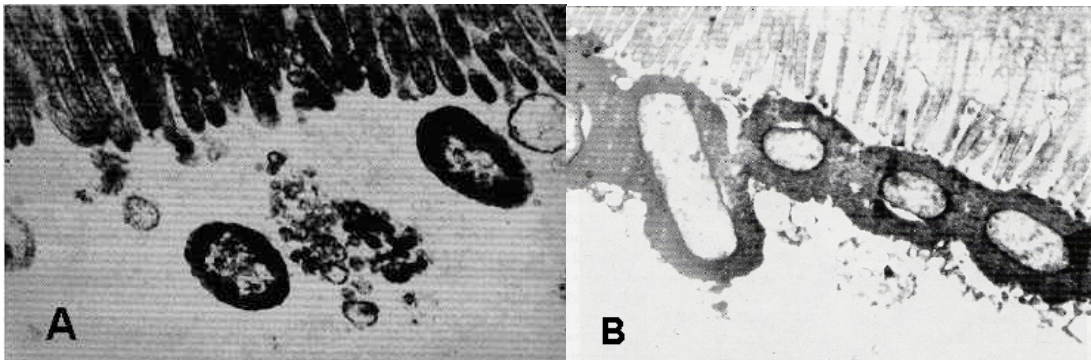
AG	antigen
AL	antilichaam
AM	antimycotica
ATP	adenosinetrifosfaat
BHI	Brain Heart Infusion broth
BHI10S	Brain Heart Infusion broth 1:10 gesupplementeerd met 1% sucrose
BHIA	Brain Heart Infusion agar
BHIS	Brain Heart Infusion broth gesupplementeerd met 1% sucrose
BHIS2X	BHIS dubbel geconcentreerd
CDC	Centers for Disease Control
CMAT	cornmeal agar met 0.5% Tween 80
DJM	deoxynojirimycine
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleïnezuur
EPS	extracellulaire polymere substanties
eps	extracellulaire polysacchariden
EUCAST	European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing
FDA	fluoresceïne diacetaat
FE	fluorescentie-eenheden
FW	steriel fysiologisch water
GLM	General Linear Model
GM	Grand Mean
GT	groene thee
GTF	glucosyltransferase
HAP	hydroxyapatiet
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KS	kunstmatig speeksel
KVE	kolonievormende eenheden
LAF	laminaire airflow
LSD	Least Significant Difference
MIC	minimum inhibitorische concentratie
MRD	Modified Robbins Device

NCCLS	National Committee of Clinical Laboratory Standards
PBS	steriele fysiologische fosfaatbuffer
PDMS	polydimethylsiloxaan
PE	plantenextracten
PI	propidiumjodide
PNPG	p-nitrofenyl-alfa-D-glucopyranoside
QS	Quorum Sensing
QSM	Quorum Sensing molecule
RMSE	Residual Mean Squared Error
SD	standaardafwijking
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDB	Sabouraud Dextrose Broth
sp.	species (enk.)
spp.	species (mv.)
TSP	tracheo-eosophagheale spraakprothese
UNIANOVA	Univariate Analysis of Variance
VC	Variatiecoëfficiënt
XTT	2,3-bis-(2- methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
YNBG	Yeast Nitrogen Base gesupplementeerd met 50 mM glucose

ALGEMENE INLEIDING OVER BIOFILMS

1. KORTE HISTORIEK

Toen J.W. Costerton en K.J. Cheng in de vroege jaren '70 met behulp van transmissie-electronenmicroscopie de microbiële ecologie van het rumen van het kalf bestudeerden, werden sterke morfologische verschillen opgemerkt tussen de kiemen *in situ* en diezelfde micro-organismen na herhaaldelijk overenten op groeimedia. Daarnaast bleek dat na ongeveer 20 wasstappen een adherente populatie van cellen nog steeds met het epitheel was geassocieerd. Bovendien leken de micro-organismen 4 tot 6 μm te “zweven” boven dit laatste (Fig. 1.1.A). Na kleuring met ruthenium rood (een polysaccharide-specifieke kleurstof) bleken deze “zwevende” cellen ingebed in een zeer dense polysaccharide matrix (Fig. 1.1.B). De “eerste” biofilm was hiermee ontdekt (Costerton et al., 1978).



Figuur 1.1. (A) Transmissie-electronenmicroscopische (TEM) opname van een sectie van het rumen van een kalf. De micro-organismen kunnen gezien worden als zwevend boven het epitheel, (B) TEM opname van een sectie van hetzelfde dier, maar nu gekleurd met ruthenium rood. De cellen zijn omgeven door een dikke laag polysaccharide. (Costerton, 2004)

De overeenstemming van deze vondst met de bevindingen van anderen zoals Henrici, die in 1933 bacteriën op een oppervlak beschreef, Zobell (1943), die sprak over mariene bacteriën geassocieerd met een glazen oppervlak en Marshall (1971), die het had over reversibele en irreversibele adhesie van mariene bacteriën aan oppervlakken, suggereerde een universaliteit van het fenomeen “biofilm”. Verder onderzoek door de groep van Costerton gebeurde vooral op aquatische ecosystemen (rivieren). Hierin werden slechts 8 tot 20 vrijlevende bacteriën per ml gevonden, terwijl er, geadheerd aan het oppervlak van de rotsen in die rivieren, 10^6 tot 10^8 cellen per cm^2 voorkwamen (Geesey et al., 1977).

Naast deze natuurlijke biofilms was het vooral de ontdekking van biofilms op medische hulpmiddelen en de hiermee samenhangende problematiek, zoals de beschadiging van het gekoloniseerde materiaal (zie 3.1.) en het risico van een persistente infectiehaard (zie 3.2.), die de interesse van de microbiologen wekte (Ghigo, 2003). Marrie et al. (1980) waren de eersten om op een urinaire Foley katheter een biofilm te beschrijven. Daarna volgden andere materialen zoals pacemakers (Marrie et al., 1982), endotracheale tubing (Sottile et al., 1986), spraakprothesen (Mahieu et al., 1986), het artificiële hart (Gristina et al., 1988), peritoneale dialyse katheter (Read et al., 1989), andere urinaire katheters (Cox et al., 1989),...

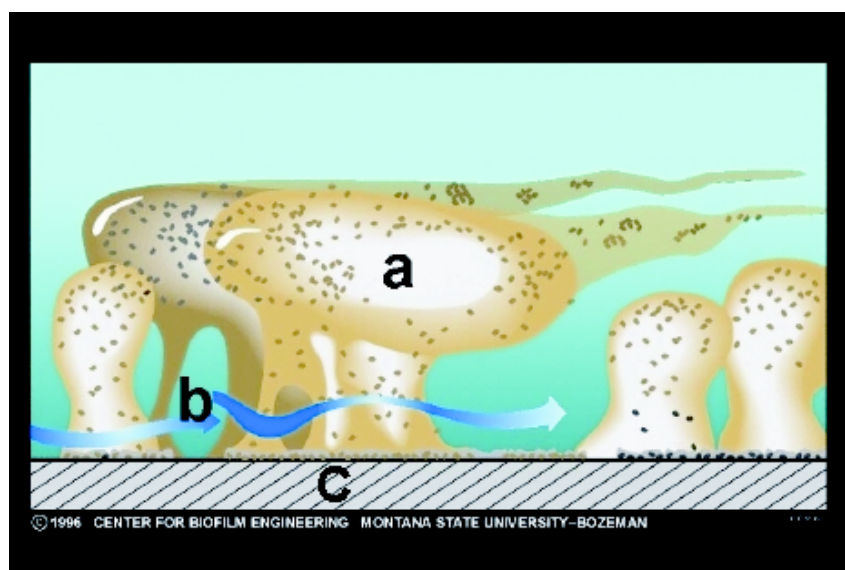
Bovenop alle biofilm gerelateerde problemen werd de ontdekking van een intrinsieke resistentie van biofilms (Nickel et al., 1985) de motor achter het biofilmonderzoek (Lazazzera, 2005). In tegenstelling tot de eerste fase van het biofilmonderzoek, die voornamelijk gericht was op de ontwikkeling van een nieuw microbiologisch concept, is er in de laatste 20 jaar gewerkt aan het beter begrijpen van wat een biofilm precies is, hoe die tot stand komt en hoe die blijft bestaan. Hierbij was het gebruik van confocale laserscanningmicroscopie voor het in kaart brengen van biofilms (Lawrence et al., 1991) en het vinden van waterkanaaltjes erin (zie 2.1.) een grote vooruitgang. Daarnaast was de karakterisatie van de fysische eigenschappen, zoals het massatransport (Lewandowski et al., 1994) en de hydrodynamica (Stoodley et al., 1994) binnen een biofilm een tweede stap voorwaarts in het begrijpen van de complexiteit van een biofilm. Eén van de laatste stappen was de ontdekking van de metabole heterogeniteit in een sessiele populatie (Lewandowski et al., 1995) en, onlosmakelijk hiermee verbonden, de communicatie tussen de cellen binnen deze populatie (Davies et al., 1998).

2. ALGEMENE PRINCIPES EN DEFINITIES

2.1. BIOFILM: DEFINITIE

Micro-organismen komen bij voorkeur in sessiele toestand voor, i.e. onder de vorm van biofilms (Jefferson, 2004; Hall-Stoodley et al., 2004). Slechts in mindere mate, voornamelijk onder laboratoriumomstandigheden, komen ze vrijlevend voor (= planktonische cellen). Biofilms kunnen worden omschreven als geïmmobiliseerde cellen die zich vastzetten op een oppervlak en een extracellulaire matrix vormen (Fig. 2.1.). Deze cellen blijven groeien en zich vermenigvuldigen, waarbij de nieuw gevormde cellen zich vasthechten aan elkaar en aan het gekoloniseerde oppervlak (Elvers en Lappin-Scott,

2000; Davey en O'Toole, 2000). De uit extracellulaire polymeren bestaande matrix bevat afvalstoffen, nutriënten en micro-organismen (Chandra et al., 2001; Kumamoto, 2002). Daarnaast bevat een biofilm ook waterkanaaltjes die zorgen voor een aan- en afvoer van nutriënten en afvalstoffen (Stoodley et al., 1994). Eenmaal gevormd, beschermt de biofilm het ingekapseld micro-organisme tegen de inwerking van desinfectantia, antibiotica en elementen van de afweer, bvb. macrofagen (Donlan, 2002). Een recente aanvulling op deze reeds veelvuldig herziene definitie is dat de cellen binnen een biofilm specifieke genexpressiepatronen vertonen, verschillend van die van planktonische cellen (O'Toole et al., 2000; Ghigo et al., 2003).



Figuur 2.1. Structuur van een biofilm met a = matrix met biofilmcellen, b = waterkanaaltje en c = oppervlak

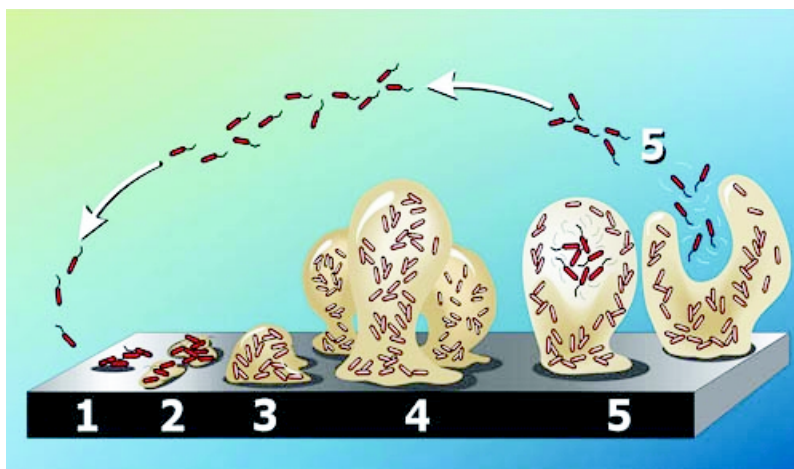
Hoewel biofilms overall voorkomen, bvb. in de natuur (Costerton et al., 1987; Eginton et al., 1998; Rayner et al., 2004) en in de industrie (Carpentier en Cerf, 1993; Szewzyk et al., 2000; Percival en Walker, 1999; Videla, 2002), zijn het vooral de medisch relevante biofilms die het meeste impact op de mens hebben. Wetenschappelijk biofilmonderzoek spitst zich dan ook vooral op deze laatste toe. Hoewel de meeste principes over medisch relevante biofilmvorming extrapoleerbaar zijn naar de andere biofilms, worden deze laatste verder in dit werk niet meer besproken.

2.2. BIOFILMVORMING

Initieel kan een conditioneringfilm worden gevormd aan een oppervlak. Polysacchariden, proteïnen, glycoproteïnen en andere macromoleculen aanwezig in de omgeving slaan neer op het oppervlak en zorgen voor specifieke en aspecifieke aanhechtingspunten voor

koloniserende micro-organismen (Steinberg en Eyal, 2002). Sommige micro-organismen bereiken vervolgens dit al-dan-niet geconditioneerde oppervlak en gaan “reversibel” adheren (= “docking”) onder invloed van omgevingsfactoren (O’Toole et al., 2000; Dunne, 2002). Van degene die adheren blijft slechts een deel vastzitten, andere cellen raken snel terug los en keren terug naar de planktonische fase. De cellen die blijven vastzitten vormen eerst een soort “anker”, waarna ze nog lijken te roteren in afwachting van het vervolledigen van nog sterkere adhesieprocessen (= “locking”) (Lappin-Scott en Bass, 2001). In deze initiële fase van oppervlakkolonisatie zullen meer cellen adheren dan er uitgroeien of loskomen. Deze adhesie van cellen (Fig. 2.2., stap 1) is de beginstap in de ontwikkeling van een biofilm en duurt slechts enkele minuten (Elvers en Lappin-Scott, 2000).

Na deze adhesiefase ontwikkelt de biofilm zich verder, waarbij de geadheerde cellen zich delen en in een beginstadium uitgroeien tot microkolonies (= kleine hoopjes cellen) (Fig. 2.2., stap 2), gescheiden door voorlopers van de latere waterkanaaltjes (Donlan, 2001b). Gelijktijdig met de vermenigvuldiging van de cellen wordt een extracellulaire polymeermatrix gevormd die de groeiende biofilm ondersteunt en zorgt voor een organisatie binnen de celpopulatie. Ook worden polymeren uit de omgeving opgenomen en gevangen in de zich ontplooiende driedimensionale biofilm (Dunne, 2002). Ondertussen passen verschillende biofilmcellen hun fysiologische processen aan (= fenotypische “switch”) als respons op de omgevings-omstandigheden in de niches waar zij groeien (Stoodley et al., 2002).

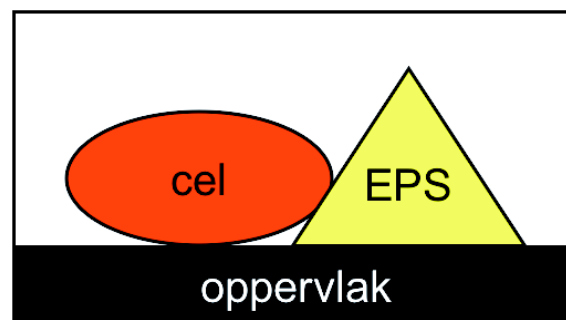


Figuur 2.2. Schematische voorstelling van biofilmontwikkeling (Center for Biofilm Engineering, MSU Bozeman, P. Dirckx)

De verdere ontwikkeling van een biofilm kan uren tot dagen duren (Fig. 2.2., stappen 3 en 4). Tot slot wordt een steady-state bekomen waarbij er een reductie van de biofilm optreedt als gevolg van verlies van cellen uit de biofilmmatrix door erosie, afwerping en afslijting (Kaplan et al., 2003a, 2003b; Ott et al., 2001). Tegelijkertijd blijft de biofilm verder doorgroeien, waarbij ook cellen uit de omgeving kunnen accumuleren (Elvers en Lappin-Scott, 2000). Het afwerpen van cellen (Fig. 2.2., stap 5) gebeurt onder invloed van omgevingsfactoren die een cellulaire respons op gang brengen (Sauer et al., 2002) en zou een mechanisme zijn om nieuwe nutriëntrijke plaatsen te zoeken, een soort “sporulatie” als het ware (Jackson et al., 2002). Hierna kan het proces van biofilmvorming opnieuw beginnen (Fig. 2.2., stap 1).

2.3. COMPONENTEN IN EEN BIOFILM

Een biofilm bestaat uit drie elementen (Fig. 2.3.), n.l. een oppervlak, microbiële cellen en een matrix. Over het algemeen genomen kan geen biofilm ontstaan zonder een samenspel van deze drie componenten.



Figuur 2.3. Schematische voorstelling van een biofilm

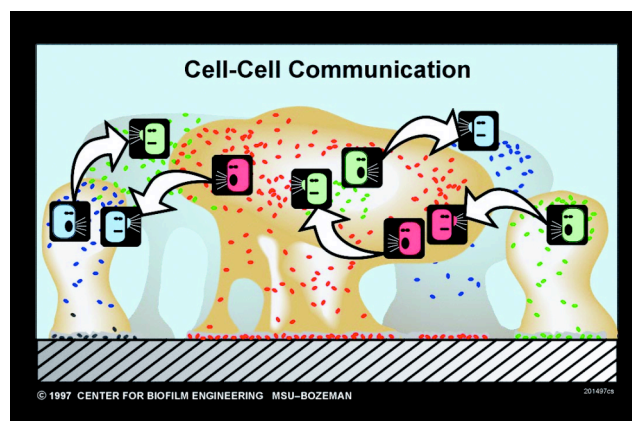
2.3.1. Oppervlak

Biofilms op medische hulpmiddelen zorgen voor de meeste problemen (Thomas et al., 2004; Neu et al., 1993). Daarenboven vormen deze materialen een ideaal oppervlak voor biofilms aangezien de meeste worden geplaatst in een omgeving die rijk is aan voedingsstoffen (weefsel, bloed...). De eigenschappen van het oppervlak spelen een grote rol in de snelheid en de mate van adhesie van de micro-organismen (Donlan, 2001a). Over het algemeen worden de ruwere en meer hydrofobe materialen preferentieel gekoloniseerd (Fletcher en Loeb, 1979; Pringle en Fletcher, 1983; Darouiche, 2001). Daarnaast kan een conditioneringlaag (zie 2.2.) op gladde en hydrofiele oppervlakken deze eigenschappen maskeren en de adhesie positief beïnvloeden (Donlan, 2001b).

Naast inerte oppervlakken, kunnen eveneens menselijke weefsels, zoals de gastro-intestinale tractus, de tanden (tandplak), de vrouwelijke genitale tractus, mucus bij mucoviscidose patiënten, het epitheel in het middenoor... overgroeid worden door biofilms (Elvers en Lappin-Scott, 2000; Costerton et al., 1999).

2.3.2. Micro-organismen

Hoewel uitzonderingen gekend zijn ("fruiting bodies" van myxobacteriën), werden micro-organismen jarenlang beschouwd als apart-levende, unicellulaire organismen. Ontdekkingen tijdens de laatste decennia hebben echter dit denkpatroon doorbroken en suggereren dat "multicellulair" gedrag (biofilms) van micro-organismen misschien eerder de regel dan de uitzondering is (Shapiro, 1998; Costerton et al., 1995; Davey en O'Toole, 2000; O'Toole et al., 2000). Het "multicellulair" gedrag van micro-organismen komt tot uiting in de coördinatie van de celactiviteiten met behulp van signaalmoleculen (= communicatie) (McLean et al., 1997; Pierson et al., 1998; Stickler et al., 1998; Charlton et al., 2000; Andersen et al., 2001; De Kievit et al., 2001a; Riedel et al., 2001; Steidle et al., 2001; Lynch et al., 2002) (Fig. 2.4.).



Figuur 2.4. Schematische voorstelling van cel tot cel communicatie binnen een biofilm

Deze communicatie kan worden opgesplitst in "egalitaire coördinatie" en "verdeling van het werk" (Branda en Kolter, 2004). De eerste soort communicatie houdt in dat iedere cel op dezelfde manier op een signaal reageert. Quorum Sensing (QS) valt onder dit principe. Iedere cel produceert een zekere hoeveelheid van een signaalmolecule en bij lage celdensiteiten is er slechts een lage concentratie van deze moleculen aanwezig. Bij hoge celdensiteiten kan de concentratie een drempelwaarde overschrijden en een respons op gang brengen (Bassler, 1999). Bij "verdeling van het werk" vertonen verschillende subsets van een populatie verschillende activiteiten in functie van de communicatie (Klausen et al.,

2003; Werner et al., 2004). Geprogrammeerde celdood van een subpopulatie onder invloed van communicatie tussen de cellen is hiervan een voorbeeld (González-Pastor et al., 2003). Hayes (2003) en Webb et al. (2003a) suggereren dit mechanisme in relatie tot het loskomen en de verspreiding van biofilms. Ook de vorming van zogenaamde persister-cellen (zie 2.4.) valt hieronder.

Beide communicatievormen steunen op hetzelfde principe, waarbij signaalmoleculen op cellulaire receptoren aangrijpen, wat via een aantal reacties uiteindelijk leidt tot een up- en downregulatie van de expressie van bepaalde genen. Een veranderd genexpressiepatroon resulteert op zijn beurt in een veranderd fenotype (= een cel met gewijzigde eigenschappen). Sauer et al. (2002) hebben aangetoond dat meer dan 50% van alle detecteerbare proteïnen differentieel (t.o.v. planktonische cellen) tot expressie komt in biofilmcellen van *Pseudomonas aeruginosa*. Er wordt echter aangenomen dat één biofilmfenotype niet bestaat, maar dat er eerder sprake is van een heterogene verzameling van verschillende fenotypes (Fux et al., 2005).

In het geval van medisch belangrijke biofilms kunnen kolonisatie en biofilmvorming aan een grote variëteit van micro-organismen te wijten zijn. Onder de Gram-positieven zijn het voornamelijk, coagulase-negatieve staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* species en *Streptococcus* species. De meest voorkomende Gram-negatieven zijn *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* en *Pseudomonas aeruginosa* (Fux et al., 2005; Donlan, 2001a). Voor de fungi zijn vooral *Candida* species biofilmvormers (Thomas et al., 2004). In Tabel 2.1 worden de meest voorkomende biofilmmicro-organismen opgesomd in functie van het oppervlak dat ze koloniseren.

Tabel 2.1. Micro-organismen gerangschikt volgens het oppervlak dat ze koloniseren

	oppervlak	micro-organismen
inert oppervlak	katheter	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i>
	kunsthartklep/ kunstheup	Gram-positieve coccen
	urinaire katheter	<i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i>
	spraakprothese	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i>
biologisch oppervlak	tanden	<i>Streptococcus</i> species
	middenoor	<i>Haemophilus influenzae</i>
	luchtwegen van mucoviscidose patiënten	<i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cepacia</i>

(Naar Fux et al., 2005; Donlan, 2001a)

2.3.3. Matrix

Hoewel de micro-organismen en het oppervlak de centrale elementen van een biofilm zijn, is de matrix zeker niet onbelangrijk. Deze slijm laag, waarin de biofilmcellen ingebed zijn, bestaat voornamelijk uit extracellulaire polymere substanties (EPS) en water (98%) (Donlan, 2001a). De samenstelling van deze slijm laag is zeer variabel naargelang het micro-organisme en zelfs naargelang de omgeving waarin een bepaald micro-organisme zich bevindt (Starkey et al., 2004).

Meestal bestaat de matrix voornamelijk uit exopolysacchariden (eps, in kleine letters om niet te verwarren met EPS) (Christensen, 1989; Cescutti et al., 1999; Sutherland en Kennedy, 1996), waarvan de concentratie echter sterk afhankelijk van omgevingsfactoren kan zijn (Jahn en Nielsen, 1998). Cellulose, alginaat en glucanen zijn een paar voorbeelden van bacteriële eps (Branda et al., 2005). Dat de eps een functie hebben in de biofilmvorming is al veelvuldig aangetoond (O'Toole et al., 2000). Daarnaast spelen eps ook een rol in de verdediging van biofilms, tegen onder meer afschuifkrachten ("shear forces"), fagocytose (Donlan en Costerton, 2002) en antimicrobiële stoffen (Lewis, 2001).

Naast eps kan de matrix ook proteïnen (Fang en Jia, 1996; Veiga et al., 1997) bevatten, o.a. lectinen, lyasen en polysaccharasen (Mitchel et al., 2002). De functie van deze proteïnen kan gaan van adhesie (lectinen) (Rickard et al., 2000) tot eps biosynthese (Lawman en Bleiweis, 1991) en verbruik van eps (lyasen/ polysaccharasen).

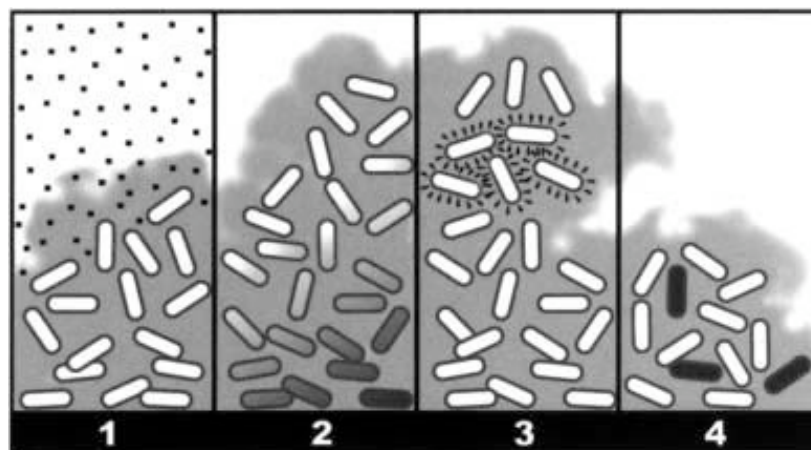
Tenslotte kan een matrix ook DNA bevatten (Tsuneda et al., 2001; Zhang et al., 1999). Er bestaan verschillende theorieën omtrent het voorkomen en de functie van dit DNA. Geprogrammeerde celdood werd reeds geopperd als een mechanisme dat aanleiding geeft tot grote (tot 20% van de matrix) hoeveelheden extracellulair DNA (Webb et al., 2003b). DNA ketens bevorderen de structurele integriteit van de biofilm (Whitchurch et al., 2002) en geven aanleiding tot horizontale gentransfer (Christensen et al. 1998; Hausner en Wuertz, 1999).

De rol van de matrix als geheel is vierledig. Ten eerste spelen de EPS een rol in de vasthechting van de micro-organismen aan een oppervlak (Christensen et al., 1985; Mack et al., 1996; Yildiz en Schoolnik, 1999). Daarnaast heeft de matrix ook een invloed op de biofilmstructuur/architectuur (Hentzer et al., 2001; Nivens et al., 2001; Schmidt en Ahring, 1999). Een derde functie van de EPS houdt verband met bescherming tegen invloeden

van buitenaf. De micro-organismen worden beschermd tegen uitdroging en nutriënttekorten doordat de EPS watermoleculen binden en kunnen fungeren als koolstof- en energiebron (Liu en Fang, 2002). Een slijm laag beschermt de onderliggende micro-organismen ook tegen fagocytose door leukocyten (Costerton et al., 1999) en tegen toxische stoffen, zoals antibiotica (Nichols et al., 1988, 1989), reactieve zuurstof (Schembri et al., 2003) en zware metalen (Teitzel en Parsek, 2003). Ten vierde speelt de matrix een rol bij de pathogenese van de biofilmvormende micro-organismen (Starkey et al., 2004). Hierbij kunnen individuele componenten van de matrix fungeren als virulentiefactoren (Kao et al., 1992).

2.4. RESISTENTIE

Resistentie van micro-organismen in tandplak (een biofilm) werd reeds in 1684 beschreven door Antonie van Leeuwenhoek. Inmiddels is dit resistentiefenomeen reeds uitvoerig bestudeerd. Eenmaal gevormd, laat de biofilm het ingesloten micro-organisme toe om, door middel van resistentie tegen antimicrobiële middelen, te blijven leven in omstandigheden waar hun planktonische tegenhangers sterven (Elvers en Lapin-Scott, 2000; Hawser et al., 1995; Baillie en Douglas, 2000). Dit fenomeen is één van de belangrijkste problemen bij de bestrijding van biofilms, maar is nog steeds niet eenduidig verklaard. Tot nu toe lijken 4 mechanismen (Fig. 2.5.) een rol te spelen bij de resistentie van biofilms (Stewart et al., 2004).



Figuur 2.5. Schematische voorstelling van de 4 hypothesen m.b.t. biofilmresistentie. 1 - vertraagde penetratie, 2 – een concentratiegradiënt aan nutriënten die aanleiding geeft tot traag groeiende (resistente) cellen (donkere cellen), 3 – een adaptieve stress respons uitgaande van cellen met een welbepaald fenotype (biofilmfenotype= gemarkeerde cellen), 4 – differentiatie van een kleine fractie van cellen in persistercellen (zwarte cellen) (Stewart, 2002)

Een eerste hypothese is een vertraagde penetratie van antimicrobiële middelen doorheen de biofilm. Stewart (1998, 2003) heeft echter aangetoond dat, indien een toegevoegde stof niet interageert met de matrix, deze in een tijdspanne van seconden of minuten de biofilm binnendringt. Dit betekent dat de diffusiesnelheid doorheen een biofilmmatrix vergelijkbaar is met die in water (slechts een factor 2 à 3 lager) (Mah et al., 2001; Stewart, 2002). Het is eerder een reactieve diffusielimitatie (Mah et al., 2003) die zorgt voor een vertraagde/verminderde blootstelling van biofilmcellen aan een antimicrobiële stof. Hierbij kunnen verschillende processen optreden, zoals ionaire interacties tussen een negatief geladen matrix en een positief geladen component (bvb. aminoglycosiden) (Gordon et al., 1988; Nichols et al., 1988; Kumon et al., 1994), covalente binding met chemisch reactieve agentia (bvb. chloor) (De Beer et al., 1994a) en enzymatische reacties (bvb. afbraak van beta-lactam antibiotica door beta-lactamasen) (Anderl et al., 2000). Deze effecten zijn echter kortstondig en kunnen de resistentie van biofilms niet volledig verklaren (Stewart et al., 1998).

Een tweede mechanisme stelt voorop dat bepaalde populaties binnen de biofilm in een veranderd microklimaat leven en dus ook een verschillende gevoeligheid vertonen (Stewart en Costerton, 2001). Deze niches kunnen worden bepaald door verschillen in pH (Zhang en Bishop, 1996), aërobiose (De Beer et al., 1994b), osmolariteit en nutriëntconcentratie (Gilbert en McBain, 2001). De eerste twee factoren kunnen een rechtstreekse invloed uitoefenen op de activiteit van antimicrobiële stoffen (Tack en Sabath, 1985), terwijl de laatste twee een invloed hebben op het micro-organisme zelf, wat op zijn beurt de doeltreffendheid van antimicrobiële producten beïnvloedt. Nutriëntlimitatie zorgt voor een vertraagde groei van het micro-organisme, wat het effect van bvb. penicillines (Tuomanen et al., 1986) negatief beïnvloedt. Osmotische stress zou de expressie van genen die coderen voor kleinere porines positief beïnvloeden, terwijl de genen die voor grotere porines coderen minder tot expressie worden gebracht (Pringent-Combaret et al., 1999). Hoewel de “microklimaat” hypothese veel verduidelijkt, kan zij niet de totale omvang van biofilmresistentie verklaren (Baillie en Douglas, 1998).

Een derde verklaring van de resistentie van biofilms heeft betrekking op het biofilmspecifiek (resistent) fenotype. Dit aspect kan op twee manieren worden bekeken. Ten eerste is er de actie-reactie theorie, waarbij blootstelling aan een antimicrobiële stof een stressrespons (met resistentie tot gevolg) opwekt in biofilmcellen. Maira-Litrán (2000a

en 2000b) en De Kievit et al. (2001b) beschrijven een stijging in expressie van genen die coderen voor “drug-efflux” pompen wanneer bacteriën aan antimicrobiële stoffen worden blootgesteld. Zo’n respons komt natuurlijk niet onmiddellijk op gang. Wanneer de buitenste cellen in een biofilm worden blootgesteld aan een antimicrobiële stof, zullen ze een signaal sturen (zie 2.3.2.) naar de onderliggende cellen. Deze krijgen op hun beurt, vanwege de beperkte diffusiebarrière (zie hoger) de tijd om de gepaste proteïnen tot expressie te brengen (Gilbert en McBain, 2001). Een tweede benadering van dit fenomeen is dat biofilmcellen intrinsiek een resistentie vertonen aan antimicrobiële stoffen. Deze theorie gaat er van uit dat alle biofilmcellen een veranderde genexpressie vertonen en dat ze zonder blootstelling aan een antimicrobiële stof reeds resistent zijn. De “switch” naar dit biofilmfenotype zou kort na de adhesie gebeuren (Ashby et al., 1994; Das et al., 1998).

Een laatste, meest recente hypothese, is die van de persistercellen (Keren et al., 2004b). De cellen van een persistente deelpopulatie zijn ongevoelig aan antimicrobiële stoffen (= multi-drugtolerant) (Brooun et al., 2000). Ze zijn daarenboven altruïstisch en geven een snelle vermenigvuldiging op, om het voortbestaan van hun populatie (Hsieh et al., 1998) in aanwezigheid van letale factoren te verzekeren (Keren et al., 2004a). Wanneer de biofilmpopulatie belaagd wordt, overleven deze persisters en “ontkiemen” ze later tot een nieuwe populatie, met opnieuw een percentage aan persisters (Lewis, 2001; Balaban et al., 2004). Het is dit percentage persisters dat het verschil zou vormen tussen biofilms en planktonische cellen (Spoering en Lewis, 2001).

3. PROBLEMATIEK VAN BIOFILMS

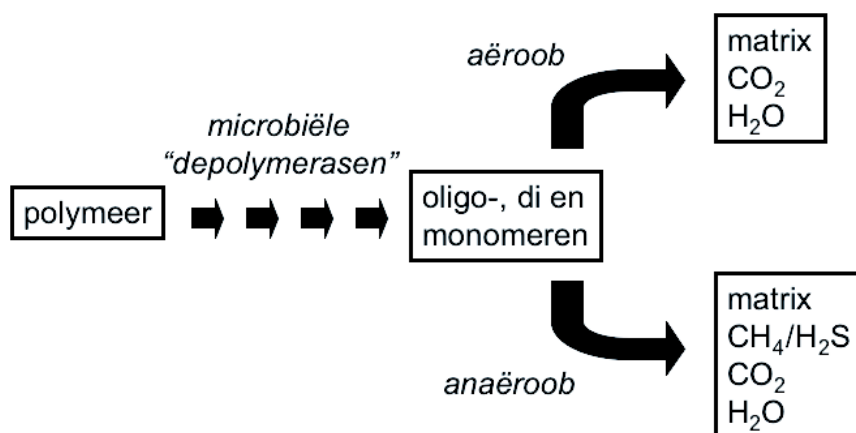
De problematiek gegenereerd door biofilms is tweërlei. Enerzijds wordt het gekoloniseerde oppervlak beschadigd, met eventueel functieverlies tot gevolg, anderzijds kunnen medisch relevante biofilms een persistente infectiehaard vormen (Darouiche, 2001; Gottenbos et al., 2002a).

3.1. BESCHADIGING VAN HET GEKOLONISEERDE OPPERVLAKE

“Biofouling” is het proces waarbij een oppervlak door een biofilm wordt aangetast. De afbraak van het oppervlak kan zowel direct, door groeiprocessen of de fysische aanwezigheid van de biofilm, als indirect, door de productie van schadelijke stoffen, gebeuren (Elvers en Lappin-Scott, 2000). Dit onderscheid hangt voornamelijk af van het micro-organisme, de fysico-chemische eigenschappen van het oppervlak en

omgevingsfactoren (Bos et al., 1999; Wiencek en Fletcher, 1995; Caldwell et al., 1997; Callow en Fletcher, 1994).

Hoewel heel wat informatie beschikbaar is over de chemische en mechanische degradatie van polymeren in het algemeen, is over de microbiële (enzymatische) afbraak van inerte synthetische polymeren zoals de siliconen, waaruit veel medische hulpmiddelen bestaan, weinig geweten (Gu, 2003). Mogelijks liggen de recente ontwikkeling van deze materialen en de langzame afbraak ervan in de natuur aan de basis van dit gebrek aan informatie. Wel is geweten dat polymeren twee fasen doorlopen in hun microbiële afbraak (Fig. 3.1.).



Figuur 3.1. Schematische voorstelling van de microbiële afbraak van polymeren (naar Gu, 2003)

Door bovenstaande processen verliezen medische hulpmiddelen hun functionaliteit en wordt vervanging dikwijls noodzakelijk (Neu et al., 1993; Busscher et al., 1994). Dit is het geval voor onder meer gewrichtsprothesen (Darouiche et al., 1997), borstimplantaten (Netsher et al., 1995), dentale implantaten (Esposito et al., 1999), spraakprothesen (Neu et al., 1993) en centrale veneuze katheters (Raad et al., 1994).

3.2. PERSISTENTE INFECTIEHAARD

Micro-organismen passen zich aan hun omgeving aan door biofilms te vormen (Parsek en Singh, 2003) die in het geval van chronische infecties, zoals otitis media, parodontitis en endocarditis (Douglas, 2003), als een persistente infectiehaard kunnen fungeren (Donlan en Costerton, 2002). Het persistent karakter van deze infecties kan verklaard worden door een samenspel van 3 mechanismen. Ten eerste kan het loskomen van cellen of celclusters van de biofilm een acute infectie veroorzaken (Hunt et al., 2004; Thormann et al., 2005; Jackson et al., 2002; Kaplan et al., 2003b; Webb et al., 2003b). Daarnaast

beschermt de biofilm de ingesloten micro-organismen tegen het immuunsysteem en antimicrobiële therapie, wat er voor zorgt dat de infectiehaard blijft persisteren (Kelly et al., 1989; Mahenthiralingam et al., 1994). Ten slotte werkt deze beschermde omgeving het ontstaan van resistente micro-organismen in de hand, wat de persistentie van de biofilm bevordert (Donlan, 2002).

Antimicrobiële therapieën bestrijden voornamelijk planktonische cellen, losgekomen van de biofilm, maar doden de biofilm zelf niet af (Costerton, et al., 1999). Vandaar dat biofilm-gerelateerde infecties heel vaak terugkerende symptomen geven na iedere antimicrobiële therapie, totdat de biofilm (bvb. een overgroeid implantaat) uiteindelijk wordt verwijderd (Costerton et al., 1995). Volgens een studie van het National Institute of Health (USA) zijn 80% van alle infecties in de Westerse wereld biofilm-gerelateerd (Costerton, 2004).

4. PREVENTIE EN ERADICATIE VAN BIOFILMS

De aanpak van de biofilmproblematiek omvat 2 twee strategieën, n.l. de preventie van de biofilmvorming en de eradicatie van een reeds gevormde biofilm. Deze strategieën kunnen de 3 basiselementen van een biofilm (oppervlak, micro-organismen en matrix) als doelwit hebben.

4.1. OPPERVLAK

Alle oppervlakmodificaties hebben als doel de biofilmvorming te voorkómen. Hierbij kan een onderscheid worden gemaakt tussen antimicrobiële en niet-antimicrobiële modificaties van het oppervlak.

Antimicrobiële modificaties kunnen op hun beurt worden ingedeeld in coating van het oppervlak en oplading van het materiaal met antimicrobiële stoffen. Het oppervlak kan worden gecoat met metalen, zoals zilver (Schierholz et al., 1998), palladium/tin (Dijk et al., 2000), goud en titanium (Arweiler-Harbeck et al., 2001) of met antimicrobiële stoffen, zoals kwaternaire ammoniumverbindingen (Gottenbos et al., 2002b). Naast antimicrobiële coatings kan ook de oplading van het materiaal met antimicrobiële stoffen de biofilmvorming voorkómen (Lewis, 2001). Hierbij kunnen materialen geïmpregneerd worden door ze in contact te brengen met oplossingen van biocompatibele antimicrobiële stoffen, zoals miconazol, minocycline, gentamycine, rifampicine, clotrimazol, chloorhexidine, e.a. , in organische solventen (Darouiche et al., 1999; Raad en Hanna, 1999; Spencer, 1999; Schierholz en Pulverer, 1998; Schierholz et al., 2000, 2002; Donelli

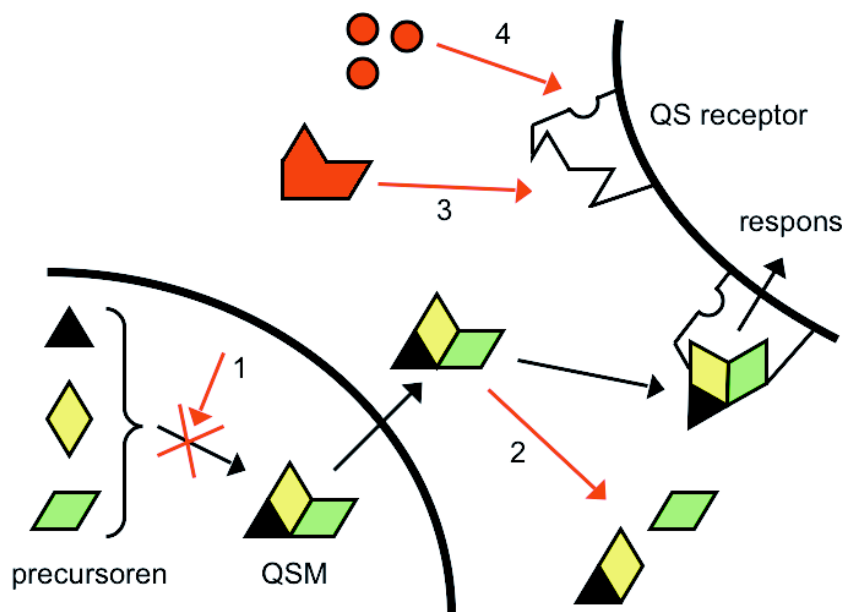
et al., 2002; Piozzi et al., 2004; Francolini et al., 2004; Boelens et al., 2000; Kohnen et al., 2003). Hierbij doet het organisch solvent de matrix van het materiaal zwellen, zodat het antimicrobieel product in het oppervlak kan diffunderen. Nadien wordt het solvent verwijderd en zit de antimicrobiële stof in het materiaal “gevangen”. Naast impregnatie kunnen antimicrobiële stoffen ook worden gemengd met een monomerenmengsel, waarna dit wordt gepolymeriseerd (= een “admixture” of “vermengd” polymeer) (Bayston, 2004). Pigno et al. (1994) incorporeerden op deze manier nystatine in een faciale prothese bestaande uit vernet polysiloxaan (= siliconenmateriaal).

Onder de niet-antimicrobiële aanpak worden de chemische en biologische coatings gerekend (Spencer, 1999). Bridgett et al (1993) toonden aan dat een hydrofiele coating op polysiloxaan de adhesie van streptococcen verminderde ten opzichte van een niet-behandeld polymeer. Everaert et al. (1997, 1998a) rapporteerden een afname in adhesie en groei van *C. albicans* op polysiloxaan in vitro na het hydrofiel maken van het oppervlak door bestraling met Argon plasma. In vivo werd op siliconenspraakprothesen, die op een gelijkaardige manier werden gemodificeerd, echter een toename in biofilmvorming bekomen. Een hydrofobe coating, n.l. van fluoro-alkylsiloxaan ketens op polysiloxaan, gaf aanleiding tot een daling in adhesie van zowel streptococcen als *C. albicans* (Everaert et al., 1998b). Een in vivo studie van perfluoro-alkylsiloxaan gemodificeerde spraakprothesen (Everaert et al., 1999) toonde aan dat lange ketens biofilmvorming verminderen, terwijl korte ketens een tegenovergesteld effect opleveren. Coatings worden ook aangewend om oppervlakken beter biocompatibel te maken (Lloyd, 2004; Palmer et al., 2004). Tenslotte kan substitutie, i.e. het kweken van een biofilm van niet-pathogene kiemen op het oppervlak, de adhesie van de pathogene micro-organismen tegengaan (Hawthorn and Reid, 1990; Darouiche et al., 2001). Deze aanpak is reeds doeltreffend gebleken bij het voorkómen van biofilmvorming op urinaire katheters (Trautner en Darouiche, 2004).

4.2. MICRO-ORGANISMEN

Zoals in 2.4 beschreven lijkt de klassieke aanpak voor de eradication van biofilms, n.l. de toediening van antimicrobiële middelen, weinig hoopvol. Daarenboven vertoont een biofilm, naast een verhoogde resistentie (Davies, 2003), een fenotypische heterogeniteit, o.a. in targets voor antimicrobiële stoffen, die er voor zorgt dat nooit alle cellen in een biofilm even doeltreffend zullen worden afgedood (Stewart en Costerton, 2001). Deze “multicellulariteit” (en ook de biofilmvorming) vloeit voornamelijk voort uit de communicatie

tussen de biofilmcellen (zie 2.3.2) (Parsek en Greenberg, 2000). Meer en meer lijkt de inhibitie van deze communicatie ("Quorum Sensing", QS) een interessant doelwit voor nieuwe antibiofilmmiddelen gericht op de sessiele cellen zelf (Hentzer et al., 2003; Fuqua en Greenberg, 2002; Smith en Iglewski, 2003; Raffa et al., 2005; Zhang en Dong, 2004). In essentie zijn er twee mogelijkheden om deze communicatie te inhiberen (Rice et al., 2005). De productie van het signaal kan worden gemoduleerd via de inhibitie van de biosynthese van de signaalmoleculen (Parsek et al., 1999; Sofer et al., 1999) of de destructie ervan (Dong et al., 2001; Leadbetter en Greenberg, 2000; Park et al., 2003). Daarnaast kunnen signaalantagonisten de interactie tussen de signaalmolecule en de receptor verstoren (Hentzer en Givskov, 2003; Hentzer et al., 2003b). Deze antagonisten kunnen synthetische analogen van QS moleculen zijn (Smith et al., 2003) of inhibitoren van natuurlijke oorsprong (Maximilien et al., 1998; Hentzer et al., 2002; Bauer en Robinson, 2002). In Fig. 4.1. worden deze mechanismen schematisch weergegeven.



Figuur 4.1. Schematische voorstelling van QS inhibitie (QSI) (1) remming van de biosynthese van Quorum Sensing Moleculen (QSM), (2) afbraak van QSM, (3) bezetten van de QSM receptor door QSM analogen, (4) niet-competitieve inhibitie van QSM

4.3. MATRIX

Zoals vermeld in 4.1 vormen het "multicellulair" karakter en de heterogeniteit van de microbiële populatie een groot probleem bij de bestrijding van biofilms. Op cellulair niveau kan dit worden aangepakt door in te werken op de communicatie tussen de micro-organismen (zie 4.1). Hoewel ook de matrixvorming meestal onder controle van QS staat, kan een afbraak van de matrix het "multicellulair" karakter van de biofilm doorbreken. Dit

kan gebeuren met behulp van enzymen, zoals alginaatlyase (Nemoto et al., 2000), streptokinase (Hatch en Shiller, 1998), proteasen (Hahn Berg et al., 2001) en cellulasen (Loiselle en Anderson, 2003), die de matrixpolymeren afbreken. Ook chemische middelen, zoals N-acetyl-L-cysteïne (Olofsson et al., 2003) kunnen de integriteit van de EPS verstoren. Een tweede manier is de inhibitie van de vorming van de matrix (Yasuda et al., 1993). Het best gekende voorbeeld hiervan is de inhibitie van de glucosyltransferasen in tandplak (zie Deel 2) (Nakahara et al., 1993).

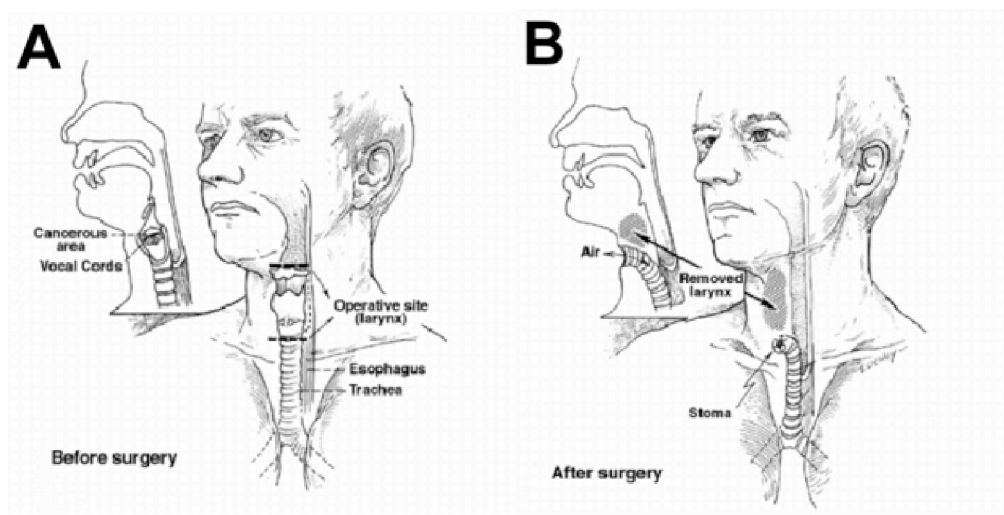
DEEL 1: *CANDIDA* SPECIES BIOFILMS OP SPRAAKPROTHESEN

1. ACHTERGROND

1.1. SPRAAKPROTHESEN

1.1.1. Laryngectomie

Spraakprothesen worden gebruikt bij patiënten die een totale laryngectomie (verwijdering van de larynx of strottenhoofd) hebben ondergaan (Fig. 1.1.). Dit wordt uitgevoerd wanneer maligne tumoren in het strottenhoofd zelf of in de buurt van het strottenhoofd voorkomen (Kasperbauer en Thomas, 2004). In het laatste geval betreft het tumoren van de hypopharynx, i.e. het deel van de keelholte dat juist boven de slokdarm is gelegen. Deze laatste is onmogelijk te opereren zonder het strottenhoofd eveneens te verwijderen, aangezien de ingreep leidt tot een verstoord slikmechanisme (verslikken).



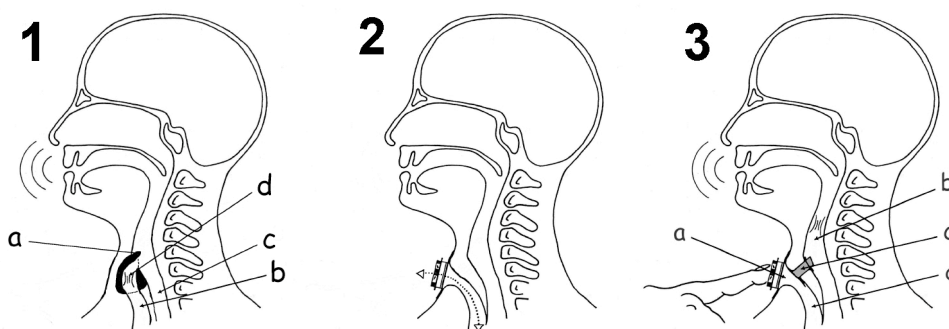
Figuur 1.1. Voorstelling van de positionering van het strottenhoofd, de luchtpijp en de slokdarm vóór (A) en na (B) een totale laryngectomie

Bij een totale laryngectomie wordt de luchtpijp naar buiten geleid en vastgehecht aan de huid in het tracheostoma en wordt de slokdarm verbonden met de mondholte. Door deze ontkoppeling van de lucht- en voedingswegen (en de mondholte) kunnen de gelaryngectomeerde patiënten niet meer op de normale manier spreken. Om op een alternatieve manier toch spraak mogelijk te maken, moet voor een basistrilling worden gezorgd, waarop resonantie (sinussen en mondholte) en articulatie (mondholte) mogelijk zijn. Deze basisfrequentie kan ontstaan via een trillend slijmvlies in de neopharynx (slokdarmspraak) of vanuit de buitenwereld met een electromechanisch toestelletje

(electrolarynx) (Brown et al., 2003; Pou, 2004). Beide technieken hebben aanzienlijk wat nadelen, zoals het moeilijk aanleren van slokdarmspraak en de monotone metaalklank van de electrolarynx (Kearney, 2004). Daartegenover levert het plaatsen een spraakprothese (TSP) (Fig. 1.2.), ontworpen door Blom en Singer in 1979, vlugger een verstaanbare, luide en vloeiende spraak op, zodat deze TSP nu bij het merendeel van de gelaryngectomeerde patiënten wordt gebruikt. Het nadeel van deze TSP is wel dat ze als gevolg van lekkage doorheen de prothese regelmatig vervangen moeten worden (Op de Coul et al., 2000) (zie 1.1.3.).

1.1.2. Spraakprothese

Een tracheo-oesophageale spraak- of stemprothese laat toe om lucht vanuit de longen in de slokdarm te brengen om zo de slokdarmmond te laten trillen. Hiervoor wordt chirurgisch een opening gemaakt tussen de luchtpijp en de slokdarm (= de fistel). Hierin wordt een TSP geplaatst die bestaat uit een siliconenbuisje met een éénrichtingsklep. Dit klepmechanisme voorkomt dat voeding, drank en slijm vanuit de slokdarm naar de luchtpijp lekken. Wanneer de via de stoma ingeademde lucht, na afsluiten van de stoma (met een vinger) uitgeademd wordt, gaat door de ontstane druk het éénrichtingsklepje open en wordt de lucht direct in de slokdarm geblazen. Deze lucht zorgt vervolgens voor een trilling van de slokdarmwand, wat geluid oplevert. Door gebruik te maken van de articulatoren (tong en lippen) worden deze klank en luchtstroom omgezet in spraak. (Hilgers et al., 1995)

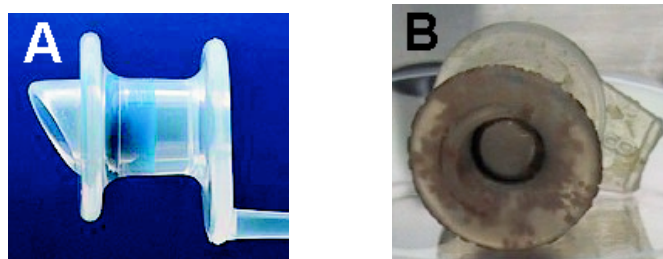


Figuur 1.2. Schematische voorstelling van de hoofd- en halsstreek van (1) een gezond persoon met a= strotklep, b= luchtpijp, c= slokdarm, d= stembanden, (2) een gelaryngectomeerde patiënt en (3) een gelaryngectomeerde patiënt met een spraakprothese, waarbij a= stoma, b= slokdarm, c= spraakprothese, d= luchtpijp (naar Hilgers et al., 1995)

Voorbeelden van spraakprothesen zijn de PROVOX[®] TSP, de Blom-Singer[®] TSP, de Groningen[®] button en de Bivona[®] valve (Bunting, 2004). Tijdens dit onderzoek wordt uitsluitend gewerkt rond en met PROVOX[®] spraakprothesen.

1.1.3. Problemen met de TSP

De belangrijkste oorzaak van lekkage door de TSP is de aanwezigheid van microbiële biofilms aan hun oppervlak (Op de Coul et al., 2000). De oesofageale zijde van de prothese, die zich in een niet-steriele omgeving bevindt, wordt snel door bacteriën en voornamelijk gisten (Ell, 1996) gekoloniseerd (= een biofilm, Fig. 1.3.). De gisten, vnl. *Candida* species (zie 1.2.), vertonen ingroei in het siliconenrubber waaruit de TSP is opgebouwd (Mahieu et al., 1986). Deze ingroei zorgt voor een vermindering van de elasticiteit van de prothese met een onvoldoende sluiten en openen van het éénwegsklepje als gevolg (Leunisse et al., 2001). Hierdoor kunnen voedsel en drank in de luchtpijp lekken, wat leidt tot frequent hoesten en eventueel een aspiratiepneumonie. Daarnaast wordt de spraak belemmerd door onvoldoende luchtstroom van de luchtpijp naar de slokdarm bij het afsluiten van de stoma bij uitademing (Oosterhof et al., 2004). Uiteindelijk moet een lekkende prothese worden vervangen (gemiddeld om de 15 weken), wat erg belastend is voor de patiënt en een grote meerkost voor de ziekteverzekering met zich meebrengt. Daarnaast ontstaan bij de vervanging microtraumata rond de fistel die kunnen leiden tot de vorming van littekenweefsel.



Figuur 1.3. Foto's van een steriele (A) en een met biofilm overgroeide (B) PROVOX[®] spraakprothese

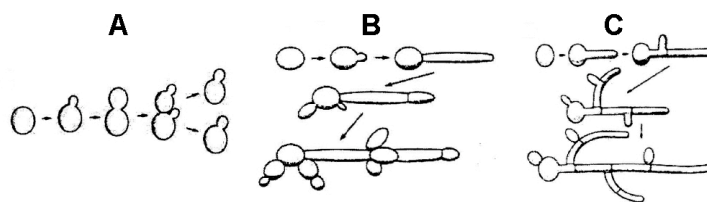
Daarenboven zou de voortdurende aanwezigheid van opportunistische en andere pathogenen in nauw contact met de mucosa van de patiënt aanleiding kunnen geven tot lokale en misschien zelfs systemische infecties (Chandra et al., 2001). De koloniserende bacteriën en gisten kunnen aanwezig zijn als commensaal in de keelholte of een exogene oorsprong hebben, met als belangrijkste bron de voeding (Izdebski et al., 1987). Vandaar dat de prothese voornamelijk wordt gekoloniseerd aan de oesophageale zijde (Mahieu et al., 1986).

1.2. CANDIDA

1.2.1. Taxonomie en eigenschappen

Candida spp. zijn gisten die behoren tot het phylum *Ascomycota*, de klasse van de *Hemiascomycetes*, de orde van de *Saccharomycetales* en de familie van de *Candidaceae* (Calderone, 2002) en zijn ééncellige, ovale of ronde eukaryotische micro-organismen met een diameter van 2 tot 10 µm. Ze hebben, in tegenstelling tot prokaryotische bacteriën, een echte kern, omgeven door een membraan, en verschillende cytoplasmatische organellen, zoals mitochondriën, endoplasmatisch reticulum en Golgi-apparaat (Deacon, 1997a). Fungi onderscheiden zich van dierlijke eukaryotische cellen o.a. door de aanwezigheid van ergosterol, in plaats van cholesterol, in hun celmembraan (Deacon, 1997c). Daarnaast hebben gisten een celwand die o.a. is opgebouwd uit chitine, een N-acetyl-glucosamine polymeer.

Het genus *Candida* omvat 154 species, waarvan binnen een klinische context slechts een aantal frequent wordt geïsoleerd, n.l. *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* en *C. parapsilosis* (Moran et al., 2002). Deze species kunnen op basis van hun biochemische eigenschappen worden gedifferentieerd (de Hoog et al., 2000). De voortplanting bij gisten gebeurt meestal door knopvorming, waarbij een knop uitgroeit tot een aparte cel die uiteindelijk loskomt van de moedercel (Calderone, 2002). Afhankelijk van het milieu en de temperatuur komen de uitgegroeide knoppen niet meteen los van de moedercel en vormen zij (pseudo-)hyfen (Fig. 1.4.) (Deacon, 1997b). Het verschil tussen pseudohyfen en echte hyfen ligt bij hun ontstaanswijze. Gisten die naast knopvorming ook pseudohyfen vormen, zoals bvb. *C. tropicalis*, worden dimorf genoemd. Polymorfe gisten, zoals bvb. *C. albicans*, kunnen daarenboven ook echte hyfen vormen. De (pseudo)hyfale vorm wordt geassocieerd met het invasief karakter van de gist, terwijl knopvorming als een indicatie voor kolonisatie wordt beschouwd (Brown, 2002). Farnesol, een QSM, speelt een rol bij de overgang van knopvorming naar (pseudo)hyfevorming (Ramage et al., 2002a; Mosel et al., 2005).



Figuur 1.4. Schematische voorstelling van knop- (A), pseudohyfe- (B) en hyfevorming (C) (naar Calderone, 2002)

Candida species vormen de belangrijkste oorzaak van opportunistische mycosen. Ze worden frequent teruggevonden als kolonisator van mucieuze membranen (Ramage et al., 2001c). Deze gisten zijn natuurlijke commensalen van de huid, de mond, de vagina en het darmstelsel en leiden bij gezonde individuen niet tot problemen, aangezien de natuurlijke afweer en bacteriële competitie de groei van commensale gisten onder controle houden. Bij verstoring van deze controlemechanismen, door o.a. immuundeficiëntie, zwangerschap, malnutritie en het gebruik van breedspectrum antibiotica, kunnen verscheidene *Candida* species pathogeen worden en een infectie (candidiasis) veroorzaken. Het klinische spectrum van candidiasis is heel uiteenlopend en omvat zowel oppervlakkige, zoals spruw en vaginale candidiasis, als invasieve infecties, zoals artritis, osteomyelitis, endocarditis, meningitis en endophthalmitis (Ruhnke, 2002; Kullberg en Filler, 2002; Filler en Kullberg, 2002).

1.2.2. Susceptibiliteit van *Candida* spp. aan antimycotica

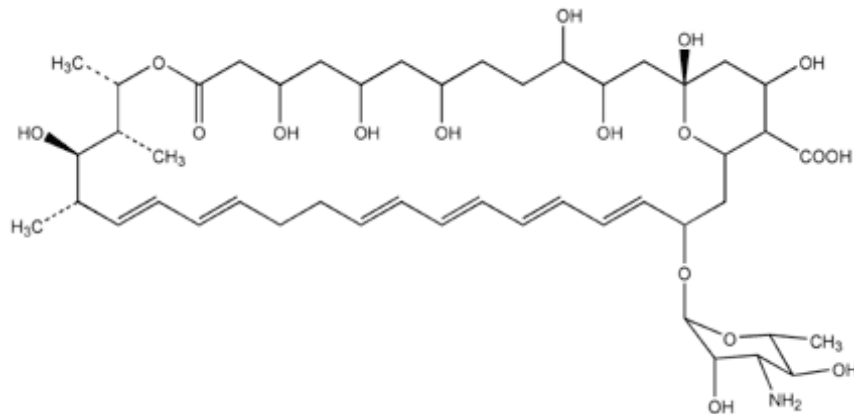
1.2.2.1. Antimycotica

De antimycotica (AM) kunnen worden onderverdeeld in antibiotica en synthetische therapeutica. Tot de eerste groep behoren de polyenen. Tot de tweede groep behoren de azolen en de allylaminen. De voornaamste “target” van AM is het ergosterol (of de enzymen die tussenkomen in de biosynthese ervan) in het cytoplasmatisch membraan van de fungi. De (quasi) afwezigheid van cytotoxiciteit ten opzichte van dierlijke eukaryotische cellen vloeit voort uit het feit dat deze laatste cholesterol en geen ergosterol in hun membraan bevatten (Mc Ginnis en Rinaldi, 1991). Sterolen zijn afwezig bij bacteriën (met uitzondering van *Mycoplasma*).

1.2.2.1.1. *Polyenen*

De polyeenantibiotica worden geproduceerd door bacteriën en bestaan uit een grote lactonring met drie tot zeven dubbele bindingen (Fig. 1.5.). Nystatine is een tetraeen macrolide dat bindt met het ergosterol van de gist en zo poriën in het membraan vormt

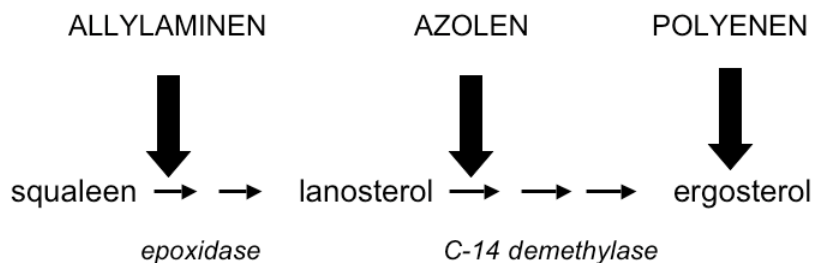
(Marty en Finkelstein, 1975). Hierdoor verliest het membraan zijn barrièrefunctie met lekkage van intracellulaire bestanddelen, zoals kationen, proteïnen en aminozuren, en tenslotte celdood tot gevolg.



Figuur 1.5. Chemische structuur van nystatine

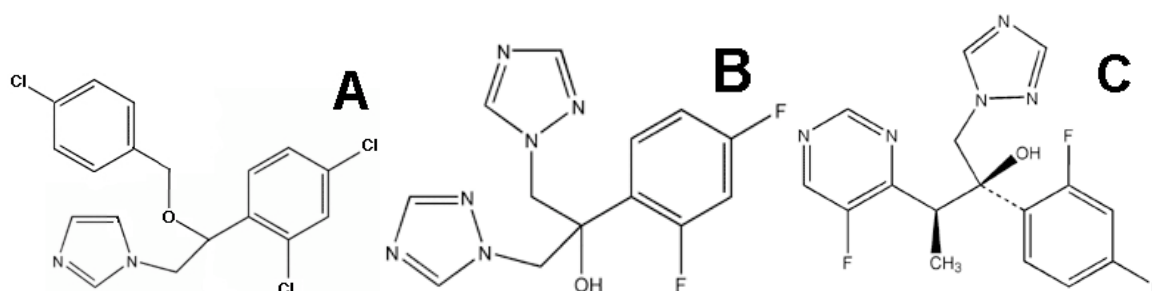
1.2.2.1.2. Azolen

De azolen zijn synthetische antimycotica en inhiberen een sleutelenzym (C-14 demethylase) in de ergosterolbiosynthese (Fig. 1.6.). Hierdoor vermindert de productie van ergosterol, ontstaat een verandering in membraanpermeabiliteit en verliest de gist essentiële celbestanddelen en zijn mogelijkheid om te delen (Hitchcock et al., 1990).



Figuur 1.6. Schematische voorstelling van de ergosterolbiosynthese door gisten en de aangrijpingspunten van antimycotica

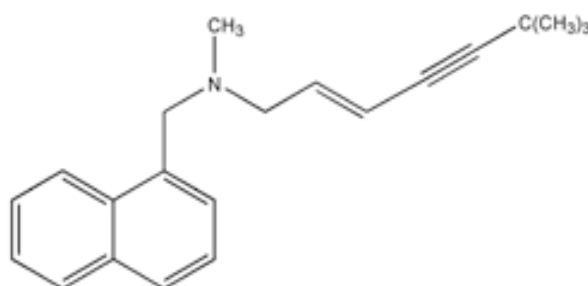
De azolen worden volgens het aantal stikstoffen in de vijfkring in twee groepen onderverdeeld: de imidazolen (twee stikstoffen) en de triazolen (drie stikstoffen). De imidazolen (bvb. miconazol, Fig. 1.7.A) worden hoofdzakelijk lokaal toegepast (McGinnis en Rinaldi, 1991), terwijl de triazolen (bvb. fluconazol en voriconazol, zie Fig. 1.7.B en C) vooral systemisch worden aangewend.



Figuur 1.7. Chemische structuren van A: miconazol, B: fluconazol en C: voriconazol

1.2.2.1.3. Allylaminen

De werking van de allylamine-verbindingen (bvb. terbinafine, Fig. 1.8.) berust op een niet-competitieve inhibitie van het enzym squaleenepoxidase in de biosynthese van het ergosterol (Fig. 1.6.). Hierdoor ontstaat depletie van ergosterol en stapelt squaleen zich intracellulair op, wat toxisch is voor de cel (Ryder et al., 1998).



Figuur 1.8. Chemische structuur van terbinafine

1.2.2.2. Resistentie

In vivo resistentie wordt gedefinieerd als persistentie of progressie van een infectie ondanks een geschikte antimicrobiële therapie (White et al., 1998). Resistentie van gisten tegen AM kan primair aanwezig zijn (de gist is reeds ongevoelig vooraleer de therapie wordt gestart, ook intrinsieke resistentie genoemd) of secundair (verworven) (White et al., 1998).

Er zijn verschillende mechanismen beschreven die verantwoordelijk zijn voor resistentie van gisten tegen AM. Aan de basis liggen genetische wijzigingen die leiden tot fenotypische veranderingen van de gistcel. Ten eerste is er de targetwijziging, waarbij de gist een nieuwe target vormt die dezelfde functie heeft als de oude target, maar minder gevoelig is voor het antimycoticum (Nolte et al., 1997; White et al., 2002; Loffler et al., 1997; Lopez-Ribot et al., 1998; Orozco et al., 1998). Ook een overproductie van de target, zodat meer antimycoticum vereist is om een zelfde effect te bereiken, is mogelijk (Marichal et al., 1997). Daarnaast kunnen een verminderde opname van AM in de cel (Loffler et al.,

2000) of een verhoogde efflux van het antimycoticum uit de cel via membraanpompen (Marr et al., 1998; Karyotakis et al., 1993) de oorzaak zijn van resistentie. Tenslotte kunnen een overgang van (pseudo)hyfaal celtype naar knopvormend celtype of omgekeerd (dimorfe en polymorfe gisten), waarbij het ene celtype gevoeliger is dan het andere, en een verandering in de interactie van AM met de target aan de basis liggen van een verminderde gevoeligheid (White et al., 1998).

Resistentie werd al uitvoerig beschreven voor de azolen, maar weinig voor de polyenen (McGinnis en Rinaldi, 1991; Ghannoum en Rice, 1999; Lupetti et al., 2002). *C. krusei* (Marichal et al., 1995; Katiyar et al., 2001) is intrinsiek resistent tegen azolen. *C. glabrata* vertoont verworven resistentie tegen de azolen (Sanglard et al., 1999). Resistentie van medisch belangrijke gisten tegen allylaminen werd nog maar zelden gerapporteerd (White et al., 1998; Ghannoum en Rice, 1999; Leber et al., 2003).

1.2.2.3. Susceptibiliteitstesten

Susceptibiliteitstesten gaan na in welke mate een micro-organisme in vitro gevoelig is aan of resistent tegen een bepaalde antimicrobiële stof. Dit gebeurt door de groei van het desbetreffend micro-organisme in aanwezigheid van verschillende concentraties aan deze stof te evalueren. De laagste concentratie aan antimicrobiële stof die een substantiële daling in groei veroorzaakt, is de minimaal inhiberende concentratie (MIC).

Om op basis van in vitro MIC-waarden van een micro-organisme een voorspelling te kunnen doen over het al dan niet slagen van een behandeling van een infectie door deze kiem, moet de MIC worden vergeleken met referentie-MIC-waarden (= breekpunten) (Sanglard, 2002). Deze laatste werden opgesteld door het NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards) en werden bekomen door de MIC-waarden voor een antimicrobiële stof met in vivo gegevens (het slagen van de behandeling) te correleren. Op dit moment zijn breekpunten voorhanden voor fluconazol (Kontoyiannis en Lewis, 2002), maar niet voor miconazol, nystatine, terbinafine en voriconazol. Op basis van deze breekpunten voor fluconazol kunnen isolaten qua gevoeligheid aan dit antimycoticum in gevoelig, gevoelig-dosisafhankelijk en resistent worden opgedeeld.

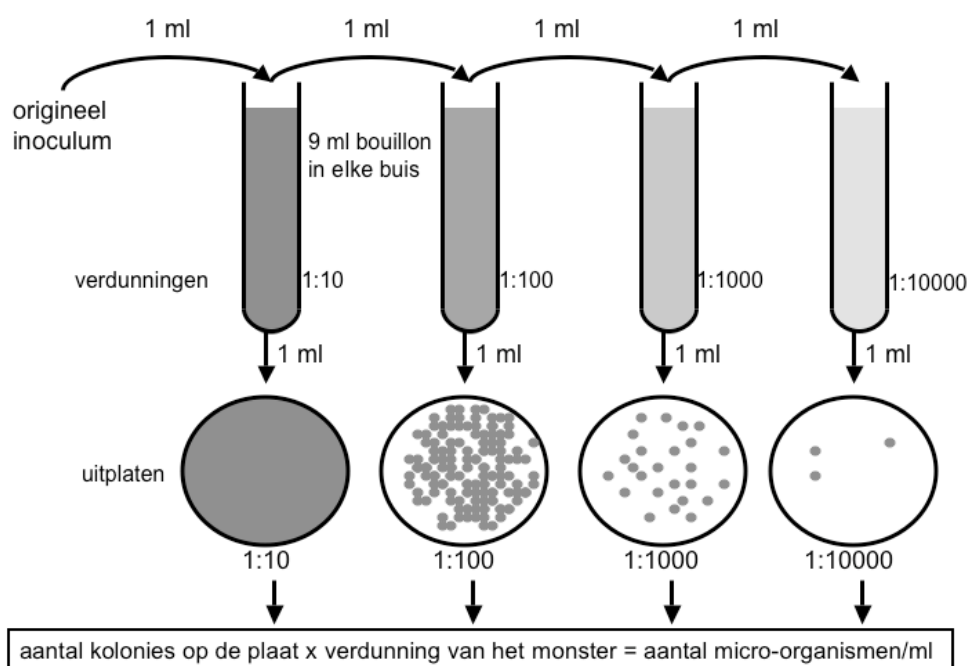
Het NCCLS heeft in 1997 een microdilutiemethode voorgesteld (M27-A) die sindsdien de gouden standaard is voor het testen van de susceptibiliteit van gisten. Recent heeft het EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing) de NCCLS-methode aangepast (Espinell-Ingroff et al., 1995; Rodríguez-Tudela et al., 2001; Chrysanthou en Cuenca-Estrella, 2002; Cuenca-Estrella et al., 2002).

1.2.3. Kwantificatie van gistcellen

De gouden standaard voor de telling van het aantal cellen is uitplating (Koch, 1994). Daarnaast worden in dit deel drie “surrogaat”-assays voor de bepaling van het aantal cellen vergeleken, n.l. twee op basis van de bepaling van een metabole activiteit en één op basis van kleurstofbinding op een cellulair element.

1.2.3.1. Plaatgietmethode

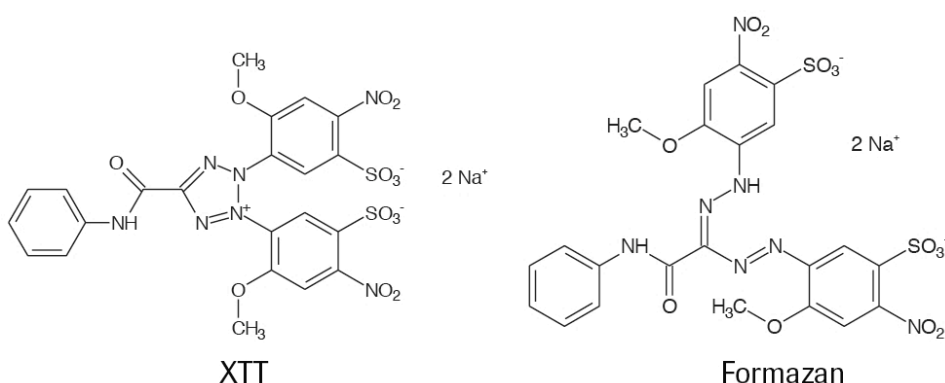
Micro-organismen in suspensie (planktonische cellen) worden na sequentiële verdunning gekwantificeerd met behulp van de plaatgietmethode. Hierbij worden het aantal kolonies na incubatie geteld en gebruikt om het aantal kolonievormende eenheden (KVE) (Fig. 1.9.) in de oorspronkelijke suspensie te berekenen. Doorheen dit proefschrift worden de resultaten van uitplating altijd uitgedrukt in “aantal cellen” i.p.v. “aantal KVE”.



Figuur 1.9. Schematische voorstelling van uitplating

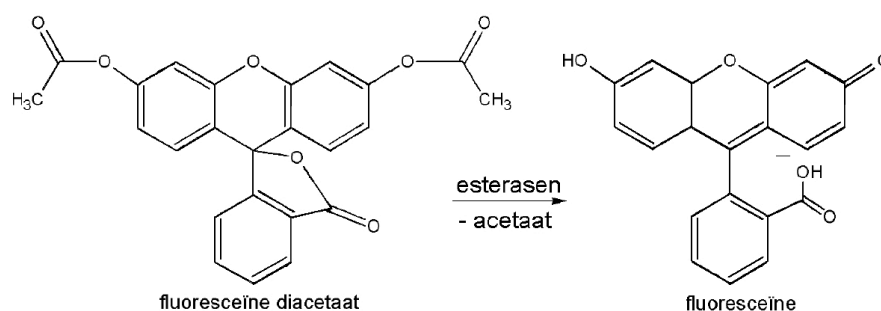
1.2.3.2. Bepaling van een metabole activiteit

Een eerste type “surrogaat”-assay meet een metabole activiteit van de cel via een respons gebaseerd op absorptie, fluorescentie of luminescentie. Een colorimetrische methode is gebaseerd op de reductie van tetrazoliumderivaten zoals 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) door cellulaire dehydrogenasen tot gekleurde formazan producten (Roehm et al., 1991; Hawser, 1996; Thom et al., 1993) (Fig. 1.10.). De absorptie van deze producten, evenredig met de totale dehydrogenase activiteit van de cellen, is een maat voor het aantal cellen (Ramage et al., 2001d; Paull et al., 1988; Meshulam et al., 1995).



Figuur 1.10. Chemische structuur van XTT en het corresponderend formazan verkregen door reductie

Een tweede techniek steunt op de fluorimetrische bepaling van de esterase-activiteit van een cel. Ieder levend micro-organisme bevat een verzameling aan enzymen die esterbindingen verbreken en de som van deze enzymactiviteiten is de esterase-activiteit van de cel. Fluoresceïne diacetaat (FDA) (Boyle en Kropp, 1992) is een fluorigeen substraat dat door deze enzymen wordt gesplitst in het fluorescente fluoresceïne en acetaat (Söderström, 1977; Visser et al., 1994) (Fig. 1.11.). FDA wordt reeds lange tijd aangewend als indicator van leefbaarheid van bacteriën (Swisher en Carrol, 1980) en gisten (Calich et al., 1979). Gultfeldt et al. (1998) beschrijven het gebruik van FDA om de proliferatie van gistcellen in suspensie te meten. Hierbij is de ontstane fluorescentie een maat voor de splitsing van FDA, proportioneel met de totale hoeveelheid esterase-activiteit en dus het totaal aantal levende cellen.



Figuur 1.11. Splitsing van FDA in fluoresceïne en acetaat

Een voorbeeld van de derde methode is het ATP assay (in dit werk niet gebruikt), waarbij de totale hoeveelheid intracellulair ATP, die evenredig is met het aantal metabool actieve cellen, aan de hand van een bioluminescentiemeting (luciferine-luciferase reactie) wordt bepaald (Newby, 2000).

1.2.3.3. Binding van een kleurstof/fluorochroom op een cellulair element

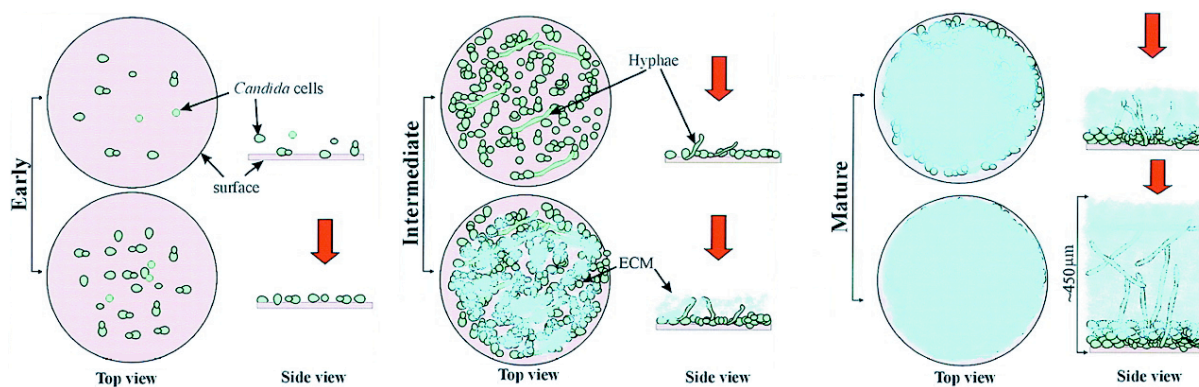
In een tweede type “surrogaat”-assay wordt een kleurstof of fluorochroom op een cellulair element gebonden. Na wegname van de niet-gebonden kleurstof is de weerhouden kleur of fluorescentie een maat voor het aantal cellen. Een elegantere variant van deze aanpak is het gebruik van fluorogene stoffen die enkel in gebonden toestand fluorescent zijn. Dit laat een “homogene” assay toe, waarbij de vrije en gebonden fracties van de kleurstof niet hoeven te worden gescheiden.

SYTO[®] 9 (structuurformule niet beschikbaar) is een fluorochroom dat enkel na binding met het DNA van een cel groen fluoresceert (Bosch et al., 2003). Aangezien deze kleurstof in staat is om zowel de micro-organismen met een intacte als een beschadigde celmembraan binnen te dringen, worden met SYTO[®] 9 alle (levende en dode) cellen fluorescent gemerkt. Dit fluorochroom wordt gebruikt voor de merking van bacteriën en gisten in combinatie met detectie via epifluorescentiemicroscopie (Ramalho et al., 2001; Vollertsen et al., 2001; Boulos et al., 1999; Terzieva et al., 1996), flow cytometrie (Virta et al., 1998; Zhang en Fang, 2004), vaste-fase cytometrie (De Vos en Nelis, 2004) en confocale laserscanningmicroscopie (Lawrence et al., 1998; Tay et al., 2003; Zhang en Fang, 2004). Chalova et al. (2004) beschrijven een methode om de biomassa van *Escherichia coli* in suspensie te bepalen met behulp van SYTO[®] 9 en een microtiterplaatlezer.

1.3. C. ALBICANS BIOFILMS

1.3.1. Ontwikkeling en architectuur van *C. albicans* biofilms

Candida biofilmgroeï doorloopt drie fasen: een vroege fase, een intermediaire fase en een maturatiefase (Chandra et al., 2001). Initieel komen de *C. albicans*-cellen in de gistvorm voor, geaderd aan het oppervlak, waar ze microkolonies vormen. De intermediaire fase wordt gekarakteriseerd door een toename in extracellulair materiaal (de matrix), dat als het ware een film vormt over de microkolonies, en de vorming van (pseudo)hyfen. In de maturatiefase gaat de ontwikkeling verder tot een dikke laag met EPS is gevormd, doorgeladen met talrijke gist(pseudo-)hyfen (Fig. 1.12.).



Figuur 1.12. Schematische voorstelling van *C. albicans* biofilmgroeï in drie fasen op siliconenschijfjes in boven- en zijaanzicht. ECM= extracellulair materiaal (naar Chandra et al., 2001)

1.3.2. In vitro systemen voor de groei/kwantificatie van *C. albicans* biofilms

In de literatuur werden reeds diverse systemen beschreven om *C. albicans* biofilms op oppervlakken te kweken. Deze kunnen worden onderverdeeld in statische systemen, zoals de koloniemethode (Al-Fattani en Douglas, 2004; Samaranayake et al., 2005), de microtiterplaatmethode (Baillie en Douglas, 1999; Ramage et al., 2001b; Kuhn et al., 2002) en groei in polystyreen buisjes (El-Azizi et al., 2004) en doorvloeisystemen, zoals de “perfused biofilm fermenter” (Baillie en Douglas, 1998), microfermentoren (García-Sánchez et al., 2004) en de Modified Robbins Devices (MRDs) (Raad et al., 2003).

Er zijn diverse technieken voorhanden om biofilms te kwantificeren. Hoewel uitplating nog steeds de gouden standaard is, blijft het een arbeidsintensieve techniek en bestaat er twijfel over de accurateheid ervan voor de kwantificatie van biofilms. Het aantal kolonies weerspiegelt, wegens eventueel onvolledig loskomen van de biofilmcellen en samenklontering (“clumping”), niet noodzakelijk het correct aantal cellen, aanwezig op het

oppervlak (Bhatti et al., 2002). Met sommige andere kwantificatietechnieken hoeven de biofilmcellen niet losgemaakt te worden. Voorbeelden hiervan zijn de bepaling van de incorporatie van [³H] Leucine en van het nat of droog gewicht van de biofilm (Hawser en Douglas, 1994; Baillie en Douglas, 1999; Kuhn et al., 2002; Mukherjee et al., 2003) en de “surrogaat”-assays (zie 1.2.3.). Onder deze laatste is het XTT-assay uitgegroeid tot een quasi standaardtechniek voor de bepaling van de biomassa van gistbiofilms (Hawser, 1996; Chandra et al., 2001; Ramage et al., 2001a, 2001b, 2002a, 2002b, 2002c, 2002d). Recent werden echter problemen met de lineariteit in respons in functie van het aantal *C. albicans*-cellen en variabiliteit tussen verschillende *Candida* species en stammen gerapporteerd (Kuhn et al., 2003).

1.3.3. *Candida* spp. biofilms op spraakprothesen

Mahieu et al. (1986) waren de eersten die de aanwezigheid van gisten, meer bepaald *Candida* spp., op spraakprothesen hebben beschreven. Hoewel deze auteurs nog geen onderscheid maakten tussen de verschillende species, werd de predominantie van gisten (80% van de gevallen), in vergelijking met bacteriën, wel duidelijk aangetoond. Het voorkomen van voornamelijk *Candida* spp. op TSPn werd bevestigd door Izdebski et al. (1987). Neu et al. rapporteerden in 1994 op 34 isolaten de predominantie van *C. albicans* (14) in vergelijking met *C. glabrata* (4), *C. krusei* (2), *C. tropicalis* (2) en *C. parapsilosis* (2). Naast deze *Candida* species werden ook 2 *Saccharomyces cerevisiae* stammen geïsoleerd. Vijf isolaten werden niet geïdentificeerd. In een studie van Van Weissenbruch et al. (1997) bij 36 patiënten werden ook in 80% van de patiënten *Candida* spp. teruggevonden, vooral *C. albicans* (44%), *C. glabrata* (25%), *C. tropicalis* (14%) en *C. krusei* (7%). *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. lusitaniae* en *C. kefyr* werden occasioneel geïsoleerd. Eerenstein et al. (1999) rapporteerden dat op 183 prothesen van 31 patiënten in 94% van de gevallen een gistspecies werd teruggevonden. In 35% van de gevallen was de TSP overgroeid door enkel *C. albicans*, in 20% door enkel *C. tropicalis*, in 4% door een ander gistspecies (*C. kefyr*, *C. krusei* of *C. parapsilosis*), in 27% door een niet-geïdentificeerd gistspecies en in 8% door meerdere gistspecies. In een onderzoek op 170 prothesen van 101 patiënten rapporteerden Bauters et al. (2002) voornamelijk *C. albicans* (41%), gevolgd door *C. glabrata* (33%), *C. krusei* (16%), *C. tropicalis* (5%) en *C. parapsilosis* (3%). In deze studie was 58% van de prothesen gekoloniseerd door één enkel gistspecies, de andere waren gekoloniseerd door meerdere gistspecies (42%).

1.4. PREVENTIE VAN GISTBIOFILMS OP SPRAAKPROTHESEN

1.4.1. Bestaande preventieve strategieën

Om de biofilmvorming op een TSP tegen te gaan bestaan er verschillende strategieën. Er kan doorheen de stoma met een borsteltje rechtstreeks een nystatinesuspensie (Nystatine[®], Sanofi-Winthrop) op de prothese worden aangebracht. Bij deze methode is de slokdarmkant van de TSP echter moeilijk te bereiken, wat een nadeel is, omdat die kant net het meest gevoelig is aan biofilmvorming. Daarnaast kan er met behulp van een pompje wasvloeistof (al dan niet met een antimycoticum erin) doorheen de prothese worden gepompt (Free te al., 2003).

Een andere mogelijkheid is het oraal aanbrengen van een miconazol gel (Daktarin[®] orale gel, Janssen Pharmaceutica), die bij het doorslikken de prothese bereikt. Omdat de gel slechts korte tijd ter hoogte van de prothese verblijft, is de doeltreffendheid ervan echter beperkt. De slokdarmkant van de TSP wordt hierbij wel goed bereikt.

Tenslotte bestaan er mucosale kleeftabletten met vertraagde vrijstelling op basis van miconazol of nystatine die, wanneer ze gekleefd worden in de mondholte, de gistkolonisatie van een TSP verminderen (Van Weissenbruch et al., 1997; Ameye et al., 2005). Ondanks de profylactische maatregelen blijft de levensduur van een TSP echter kort.

1.4.2. Nieuwe preventieve strategieën

Onder antimycotische therapie wordt de blootstelling van gistbiofilms aan antimycotische stoffen verstaan. Slechts weinig AM hebben een effect op gistbiofilms (Chandra et al., 2001; Bachmann et al., 2003). Nochtans is er preliminaire evidentie dat antimicrobiële middelen, zoals nystatine en de azolen, in sub-MIC-concentraties een negatief effect kunnen uitoefenen op de biofilmontwikkeling van *Candida* spp. (Ellepola et al., 1998; Kuhn et al., 2002; Cerca et al., 2005). Naast AM lijken ook mucolytica, zoals N-acetyl-L-cysteïne, en antimicrobiële proteïnen en peptiden interessant voor de behandeling en de preventie van gistbiofilms (Elving et al., 2000; Oosterhof et al., 2003; Schwandt et al., 2004; Kuhn en Ghannoum, 2004). Daarnaast zou het gebruik van QSM (zie Algemene inleiding), zoals farnesol, een effect op de maturatie van gistbiofilms vertonen (Ramage et al., 2002a).

Coating en modificatie van het oppervlak van (spraak)prothesen met chemische en/of antimicrobiële middelen als preventie voor (gist)biofilmvorming worden reeds lange tijd onderzocht. Hierbij gaat het voor de antimicrobiële deklagen voornamelijk over behandeling van het siliconenoppervlak met metalen, zoals palladium/tin (Dijk et al., 2000), goud en titanium (Arweiler-Harbeck et al., 2001) of met antimicrobiële stoffen, zoals kwaternaire ammoniumverbindingen (Gottenbos et al., 2002b) en jodium-povidon (Imbert et al., 2003). Het vervaardigen van geïmpregneerd of “vermengd” polysiloxaan als preventie van gistbiofilmvorming op spraakprothesen is nog niet onderzocht. Bij de niet-antimicrobiële modificaties horen de chemische die de hydrofobiciteit (Everaert et al., 1997, 1998a, 1998b, 1999) van een oppervlak veranderen (cfr. Algemene inleiding 4.1.). Daarnaast kan de preadsorptie van biosurfactanten van “onschadelijke” micro-organismen, bvb. *Streptococcus thermophilus B*, op een siliconenoppervlak leiden tot een verminderde adhesie van gisten (Busscher et al., 1997). Zo hebben ook probiotica, op basis van *Lactobacillus* of *Bifidobacterium* species (van der Mei et al., 2000), en zuivelproducten (Busscher et al., 1998, 2000; Free et al., 2000; Schwandt et al., 2004) een negatieve invloed op de biofilmontwikkeling op spraakprothesen.

Een recente ontwikkeling om de TSP problemen te voorkómen is de PROVOX[®] ActiValve (Hilgers et al., 2003). Deze prothese heeft een actief klepmechanisme dat sluit met behulp van magneetjes, wat vroegtijdig lekken voorkómt. Daarenboven bestaat het klepmechanisme in plaats van polysiloxaan uit een Teflon-achtig materiaal, dat minder vatbaar is voor biofilmvorming.

2. SPECIFIEKE OBJECTIEVEN

In dit eerste deel van het proefschrift wordt een nieuwe strategie voor de preventie van gistkolonisatie van TSPn uitgewerkt. Die heeft tot doel om het oppervlak, naast het micro-organisme en de matrix één van de drie de componenten van een biofilm, antimycotisch te maken door middel van oplading van het polysiloxaan met een antimycoticum. Hierbij worden drie specifieke doelstellingen vooropgesteld:

1. Vooreerst wordt het voorkomen van de verschillende gistspecies op spraakprothesen in kaart gebracht en wordt de susceptibiliteit van de gistisolaten aan verschillende AM bepaald, met de bedoeling om een geschikt antimycoticum te selecteren voor de incorporatie in polysiloxaan.
2. Om de doeltreffendheid van het antimycotisch polysiloxaan in het voorkómen van *C. albicans* biofilmvorming na te gaan, worden in vitro systemen voor de groei en kwantificatie van biofilms van dit *Candida* species ontwikkeld.
3. Tenslotte wordt antimycotische siliconen bereid via oplading vóór en na vulkanisatie van het polysiloxaan. De vrijstelling en het antimycotisch effect van het opgeladen antimycoticum worden nagegaan met behulp van HPLC en een diskdiffusietest. Het effect op de biofilmvorming door *C. albicans* wordt geëvalueerd aan de hand van de ontwikkelde biofilmsystemen en kwantificatietechnieken.

3. VÓORKOMEN EN SUSCEPTIBILITEIT VAN GISTEN OP TSPn

Aangezien voornamelijk gisten verantwoordelijk zijn voor de ingroei in het polysiloxaan van spraakprothesen, worden eerst hun vóorkomen (3.1.) en susceptibiliteit (3.2.) onderzocht.

3.1. ISOLATIE EN IDENTIFICATIE VAN GISTEN AFKOMSTIG VAN TSPn

3.1.1. Principe

In dit deel van het onderzoek wordt het vóorkomen van gisten op TSPn nagegaan. Hiertoe worden biofilms op de verwijderde prothesen losgemaakt en in suspensie gebracht. Vervolgens worden de verschillende gistspecies hieruit geïsoleerd. De isolaten worden met behulp van fenotypische methoden geïdentificeerd. In dit werk wordt, in tegenstelling tot vorige studies, bij de interpretatie van de resultaten rekening gehouden met de afhankelijkheid van de samenstelling van de biofilms gevonden op prothesen van dezelfde patiënt.

3.1.2. Materialen en methoden

3.1.2.1. Klinische monsters

De spraakprothesen (105, van het type PROVOX[®]) worden in de polikliniek van het Departement Hoofd- en Halschirurgie van het Universitair Ziekenhuis Gent verwijderd bij patiënten bij wie het klinisch beeld dat vereist (72 verschillende patiënten). Na verwijdering worden de prothesen zo snel mogelijk getransporteerd naar het Laboratorium voor Farmaceutische Microbiologie voor analyse.

3.1.2.2. Isolatie

Een verwijderde prothese wordt in gebufferd pepton (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) gebracht en door krachtig vortex-mixen (1 min) worden de geadheerde gisten losgemaakt. Vervolgens wordt de suspensie gefiltreerd over een 0.45 µm nylon membraanfilter (Nylaflor[®], Gelman Sciences, Ann Arbor, MI), waarna deze laatste wordt geïncubeerd op een CHROMagarTM Candida-bodem (CHROMagar Co., Parijs, Frankrijk) gedurende 48 uur bij 37°C (San-Millán et al., 1996; Willinger en Manafi, 1999; Murray et al., 2005). CHROMagarTM Candida is een selectief, differentieel, vast groeimedium dat chromogene stoffen bevat. Deze kleurloze producten zijn substraten voor species-specifieke

gistenzymen en geven na hydrolyse een gekleurd product dat de kolonie een typische kleur geeft. Aan de hand van de kleur worden de verschillende species gedifferentieerd.

Na incubatie wordt van de kolonies met een verschillende kleur en morfologie een reïncultuur gemaakt op CHROMagar™ Candida. Eén kolonie van de bekomen culturen wordt tenslotte overgeënt op Sabouraud dextrose agar (SDA; BD) en bewaard bij 4°C voor verdere identificatie.

3.1.2.3. Identificatie

Aan de hand van de typische kleur van de kolonies op CHROMagar™ Candida, kan een presumptieve identificatie (Odds en Bernaerts, 1994) van *C. albicans* en *C. dubliniensis* (groen), *C. tropicalis* (donkerblauw) en *C. krusei* (roze en typische vaag begrensde kolonies) gebeuren.

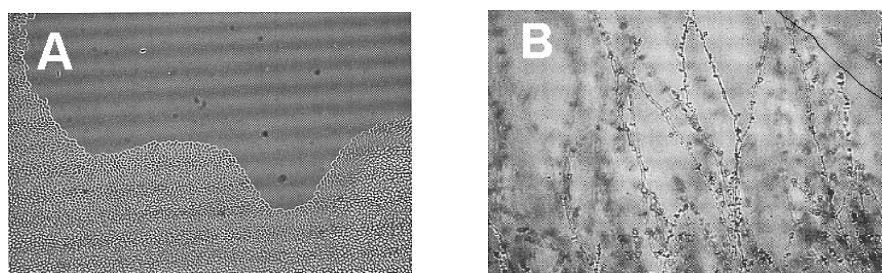
De identiteit van *C. albicans* wordt vervolgens bevestigd aan de hand van een kiembuistest (Freydière et al., 2001). Hiertoe wordt een suspensie van de te testen gistcultuur in serum bereid en geïncubeerd bij 37°C gedurende 2 à 3 uur. De inductie van de hyfenvorming (= kiembuisjes), die kenmerkend is voor *C. albicans*, wordt microscopisch bevestigd.

Ook *C. dubliniensis*, voor het eerst beschreven in 1995 (Sullivan et al., 1995), vormt in de bovenstaande test kiembuisjes. Het onderscheid tussen *C. dubliniensis* en *C. albicans* wordt gemaakt door de groei bij 45°C na te gaan. *C. albicans* is in staat bij deze temperatuur te groeien, *C. dubliniensis* daarentegen niet (Pinjon et al., 1998; Gales et al., 1999).

Als bevestigende test voor *C. krusei* wordt een commercieel verkrijgbare immunologische agglutinatietest gebruikt (Krusei-Color™ Fumouze, Levallois-Perret, Frankrijk). Deze testkit bevat een suspensie van gekleurde latexpartikels met daarop specifieke antilichamen (AL) tegen *C. krusei*. Wanneer deze antilichamen binden met de antigenen (AG) op *C. krusei*, ontstaat er een vernet partikel-AL-AG-cel complex dat neerslaat. Praktisch wordt een kolonie van het vermoedelijk *C. krusei* isolaat met een druppel van de antilichaamsuspensie gemengd. De test is positief als er binnen de vijf minuten agglutinatie optreedt (Freydière et al., 2001).

Op de andere isolaten (blauw, paars, wit of andere kleur) wordt eerst een trehalose-test uitgevoerd om een onderscheid te maken tussen *C. glabrata* en andere *Candida* species. *C. glabrata* heeft de eigenschap om, in tegenstelling tot andere species, zeer snel trehalose te hydrolyseren tot glucose (Freydière et al., 2002). Eén kolonie van het onbekend isolaat wordt overgebracht in 50 µl steriele citraatbuffer (0.1 M, pH 5.0) die 4% trehalose bevat. De suspensie wordt geïncubeerd bij 37°C gedurende 3 uur. Het eventueel gevormde glucose wordt gedetecteerd met behulp van een glucose-teststrip (Diabur-Test® 5000, Roche, Basel, Zwitserland). Hiertoe wordt 10 µl van de geïncubeerde suspensie op de teststrip gebracht. Indien er na 2 min verkleuring optreedt, geeft dit een sterk vermoeden van *C. glabrata* (Peltroche-Llacsahuanga et al., 1999).

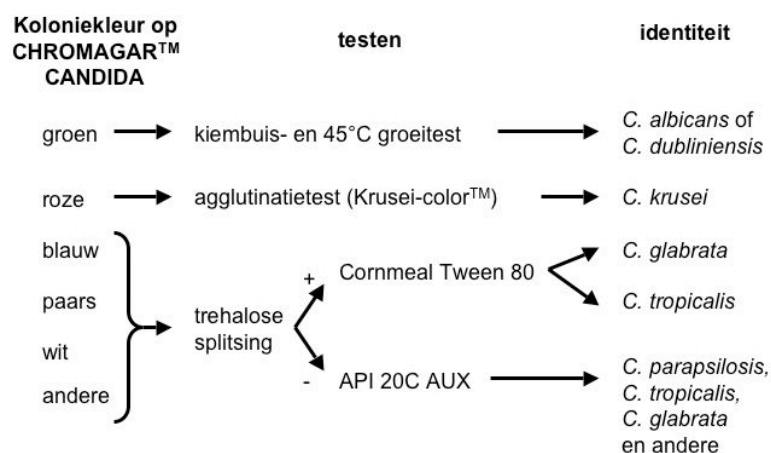
C. tropicalis kan in de trehalose-test vals positieve resultaten geven (2% van de gevallen) (Peltroche-Llacsahuanga et al., 1999). Om dit species van *C. glabrata* te onderscheiden, wordt de morfologie van trehalose-positieve isolaten op Cornmeal agar + 0.5% Tween 80 (CMAT) microscopisch nagegaan. *C. glabrata* is immers geen dimorf gist, *C. tropicalis* wel (Fig. 2.1.) (Larone, 1995). CMAT is een vaste bodem waarop het gist na enten bedekt wordt met een dekglasje. De plaat wordt 3 dagen geïncubeerd bij 30°C en dan microscopisch bekeken. Tween 80 wordt toegevoegd om de oppervlaktespanning te doen dalen, waardoor de gist uitgestrekter groeit.



Figuur 2.1. Microscopische opnamen van de groei van *C. glabrata* (A) en *C. tropicalis* (B) op Cornmeal agar + 0.5% Tween 80 (naar Larone, 1995)

Isolaten die een trehalose negatief resultaat geven (geen verkleuring), worden geïdentificeerd via het API-20 C AUX systeem (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankrijk) (Verweij et al., 1999), een identificatiesysteem gebaseerd op species-specifieke suikerassimilatie en aan- of afwezigheid van (pseudo)hyfen. De 20 kuipjes van een API-strip, waarvan 19 een gedehydrateerde koolstofbron bevatten en 1 als controlekuipje (geen koolstofbron) dient, worden gevuld met een suspensie van het te identificeren isolaat in een minimaal medium. De strip wordt bij 30°C geïncubeerd en de groei wordt

visueel beoordeeld na 24, 48 en 72 uur. Het onbekend isolaat wordt ook geënt op CMAT en na 72 uur incubatie bij 30°C wordt er microscopisch gecontroleerd of (pseudo)hyfen aanwezig zijn. Met de reeks van 20 positieve/negatieve API-resultaten (controle niet meegerekend) komt een cijfercode overeen die op haar beurt overeenstemt met een bepaald species. In Fig. 2.2. wordt het totale identificatieverloop schematisch weergegeven.



Figuur 2.2. Schematische voorstelling van het verloop van de identificatie van de gistisolaten

3.1.3. Resultaten

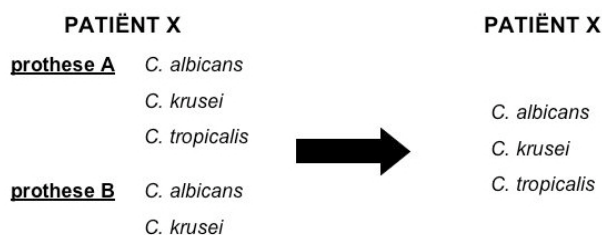
Op 103 prothesen worden gisten (233 isolaten) teruggevonden, van 2 TSPn, afkomstig van dezelfde patiënt, wordt een schimmel (*Fusarium solani*) geïsoleerd.

3.1.3.1. Opzuivering van de gegevens

Vijf van de 233 gistisolaten zijn niet éénduidig te identificeren en worden verder als onbekend beschouwd. Op sommige prothesen worden meerdere isolaten van *C. glabrata*, *C. parapsilosis* en *S. cerevisiae* teruggevonden. Op CHROMagar™ Candida geven kolonies van deze species soms kleine kleurverschillen, waardoor ze als verschillende isolaten worden beschouwd. Als deze na verdere identificatie echter tot hetzelfde species blijken te behoren, wordt slechts 1 isolaat behouden. Dit herleidt het aantal isolaten van 233 tot 214.

Van sommige patiënten worden twee of meerdere prothesen geanalyseerd. Aangezien de samenstelling van de gistpopulaties van deze prothesen niet onafhankelijk is, wordt een ontubbeling van de resultaten uitgevoerd. In Fig. 2.3. wordt een voorbeeld van deze

ontdubbeling gegeven. Van ééNZelfde patiënt (X) worden twee prothesen (A en B) geanalyseerd en de 5 isolaten worden tot 3 herleid.

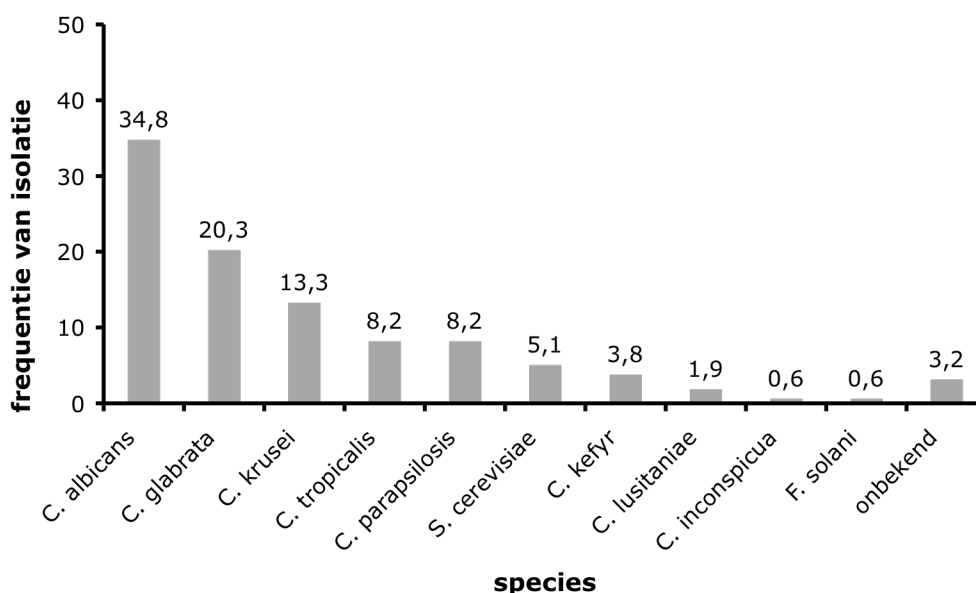


Figuur 2.3. Schematische voorstelling van een ontduubeling van isolaten per patiënt

Na opzuivering van de resultaten zoals hierboven beschreven, blijven er 158 isolaten, afkomstig van 72 patiënten, voor verdere analyse over.

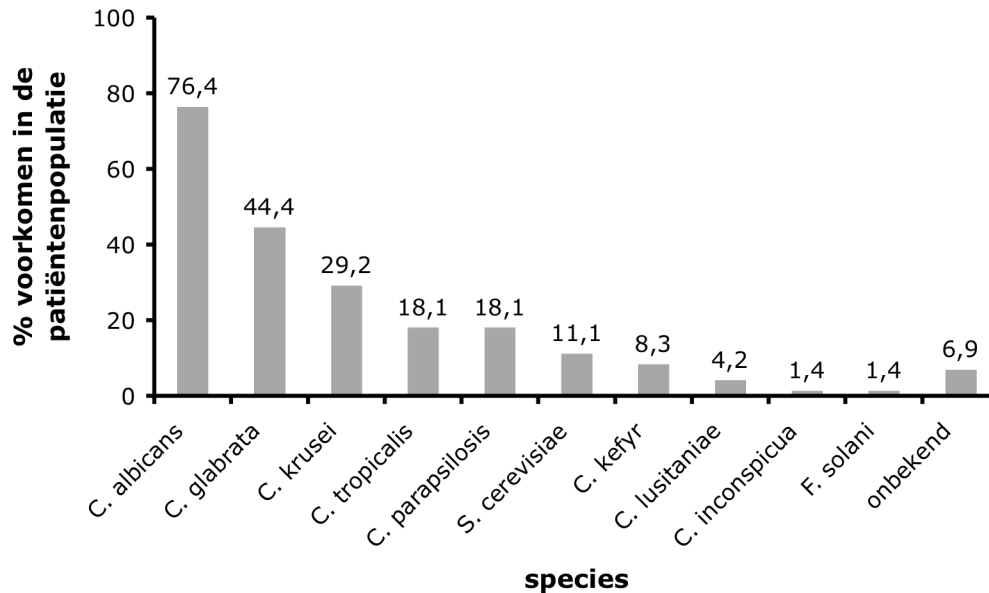
3.1.3.2. Speciesfrequentie.

In Fig. 2.4. wordt de frequentie van het vóorkomen van de verschillende species weergegeven. *C. albicans* is het meest vóorkomend species en vertegenwoordigt één derde van de isolaten. *C. glabrata* (20.3%) is het op één na meest vóorkomende species, gevolgd door *C. krusei* met 13.3% en *C. tropicalis* en *parapsilosis*, beide met 8.2%.



Figuur 2.4. Frequentie van isolatie (% van het totaal aantal isolaten, n = 158) van gisten/schimmels uit 72 patiënten

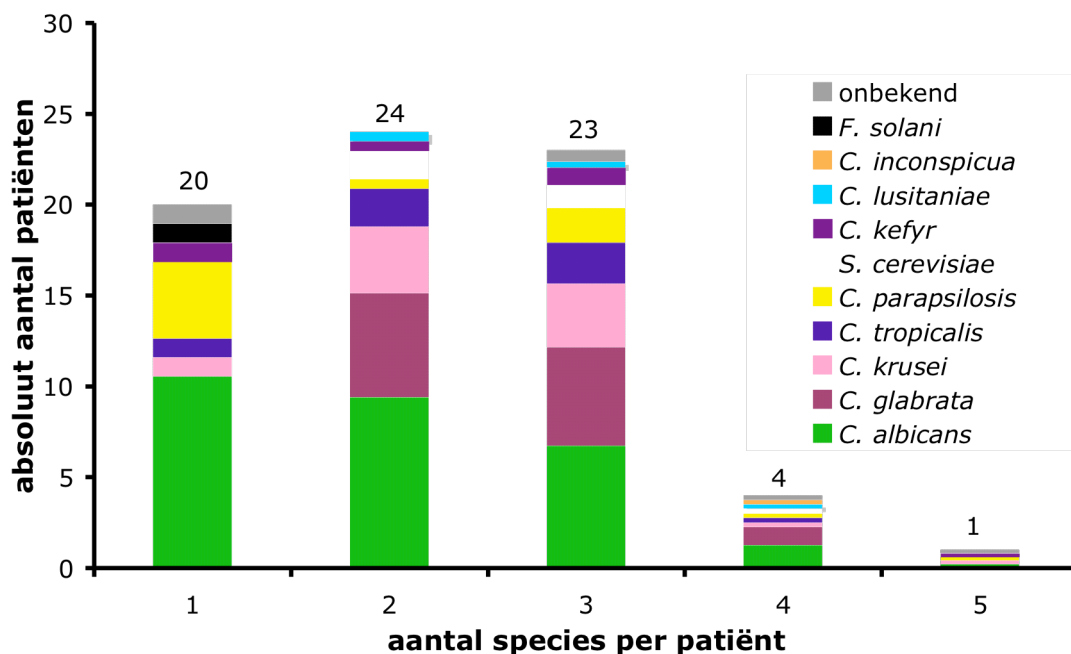
In Fig. 2.5. wordt de distributie van de species in de totale patiëntenpopulatie voorgesteld. *C. albicans* komt bij \pm drie vierde van de patiënten voor. Minder dan de helft heeft een prothese waarop *C. glabrata* wordt teruggevonden. *C. krusei* komt bij ongeveer één derde voor, de overige species komen bij minder dan één vijfde van de patiënten voor.



Figuur 2.5. Voorkomen (%) van de verschillende gisten/schimmels in de totale patiëntenpopulatie (n=72)

3.1.3.3. Frequentie van het aantal species.

In Fig. 2.6. wordt de frequentie van het aantal species in de totale patiëntenpopulatie voorgesteld, met daarin de (procentuele) onderverdeling per species. Hieruit blijkt dat de prothesen van ongeveer één vierde van de patiënten slechts 1 species bevatten, terwijl bij de rest 2 of meerdere species worden geïsoleerd. Uitzonderlijk worden op één PROVOX® 5 verschillende species teruggevonden. Opmerkelijk is dat *C. glabrata* niet voorkomt als “single-species” biofilm, ondanks het feit dat dit species wel 20% van de gistpopulatie van de andere (“multi-species”) biofilms uitmaakt. Ook *C. krusei* is ondervertegenwoordigd bij de “single-species” biofilms, n.l. 5% tegenover de 15 en 16% bij de biofilms die bestaan uit 2 en 3 species. *C. parapsilosis* daarentegen komt vooral voor in een “single-species” biofilm ($\pm 20\%$), maar veel minder in een “multi-species” biofilm (2-8%).



Figuur 2.6. Aantal patiënten in functie van het aantal verschillende species dat op hun prothese(n) (n=72) wordt gevonden. Per staaf is de frequentie (in %) van ieder individueel species weergegeven.

3.1.4. Bespreking

Het vóorkomen van gisten op TSPn werd reeds herhaaldelijk beschreven (Van Weissenbruch et al., 1997; Eerenstein et al., 1999; Bauters et al., 2002), maar in deze vorige studies werd geen rekening gehouden met de afhankelijkheid van de resultaten van TSPn van éénzelfde patiënt. Aangezien een nieuw geplaatste prothese zeer snel door de reeds aanwezige gisten in de fistel (afkomstig van de verwijderde prothese) wordt gekoloniseerd, kunnen de gistpopulaties van prothesen van dezelfde patiënt niet als onafhankelijk worden beschouwd. Bij een vergelijking tussen de gegevens van deze studie en die van voorgaande onderzoeken dient dus met dit verschil rekening te worden gehouden. De resultaten van deze studie zijn daardoor wellicht een meer accurate weergave van het vóorkomen van gisten op TSPn.

Qua speciesfrequentie (binnen het totaal aantal isolaten) in onze studie, is het vóorkomen van *C. albicans* (35%), *C. glabrata* (20%), *C. krusei* (13%) en *C. tropicalis* (8%) ongeveer in overeenstemming met dat van de voorgaande studies, n.l. respectievelijk 35-44%, 25-33%, 7-16% en 5-14%. Opmerkelijk is wel het hoger aantal *C. parapsilosis* isolaten dat in onze studie wordt teruggevonden. Daarnaast worden in zowel de studie van Bauters et al. (2002) als in onze studie minder *C. tropicalis* isolaten teruggevonden in vergelijking met

die van Van Weissenbruch et al. (1997) en Eerenstein et al. (1999). In onze studie worden ook voor de eerste keer *C. inconspicua* en *Fusarium solani* van TSPn geïsoleerd.

Het voorkomen van meerdere gistspecies op één TSP verschilt in belangrijke mate met dat in andere studies. Eerenstein et al. (1999) hebben dit gerapporteerd voor slechts 8% van de geanalyseerde TSPn. Bauters et al. (2002) beschrijven een frequentie van 58% van de prothesen gekoloniseerd door één enkel gistspecies, tegenover 42% gekoloniseerd door meerdere gistspecies. In onze studie komt een “single-species” gistbiofilm slechts in 25% van de gevallen voor, terwijl er meerdere species worden teruggevonden bij driekwart van de patiënten. De hoger besproken ontdebelling per patiënt kan hier een verklaring voor zijn, aangezien alle verschillende species die op de prothesen van een patiënt voorkomen, samen tot één gistpopulatie van deze patiënt worden gerekend (cfr. de hoger besproken ontdebelling per patiënt). Het is meestal zo dat wanneer bvb. op één prothese van een patiënt enkel *C. albicans* wordt teruggevonden, er op een andere prothese dikwijls nog een ander species naast *C. albicans* wordt geïsoleerd. De ontdebelling leidt er dan ook toe dat de eerste prothese (met “single-species” biofilm) samen wordt genomen met de tweede prothese als een “multi-species” biofilm. Het voorkomen van enkel *C. albicans* op de eerste prothese wordt als het ware als een artefact van de manier van isolatie bekeken, waarbij wordt verondersteld dat het mineure species, dat op de tweede prothese voorkomt, ook op de eerste prothese aanwezig was, maar er niet van geïsoleerd werd.

In deze studie wordt voor het eerst het voorkomen van de verschillende species binnen “multi-species” biofilms beschreven. Opmerkelijke observaties zijn dat *C. glabrata* en *C. krusei* niet als “single-species” biofilm voorkomen. *C. parapsilosis* daarentegen is vooral een “single-species” biofilmvormer.

3.1.5. Besluit

Deze studie bevestigt dat *C. albicans* het meest voorkomende gistspecies op spraakprothesen is. Daarnaast is het ook het species dat het meest alleen voorkomt op TSP, dus in een “single-species” biofilm. Preventie en behandeling van de biofilmvorming op TSP zouden dus in eerste instantie best gericht zijn op dit *Candida* species.

3.2. SUSCEPTIBILITEIT VAN TSP ISOLATEN

3.2.1. Principe

De susceptibiliteit van 93 geïsoleerde gisten voor 5 AM (fluconazol, miconazol, nystatine, terbinafine en voriconazol) wordt getest met behulp van twee semi-geautomatiseerde microdilutiemethoden: de algemeen aanvaarde microdilutie-referentiemethode, voorgesteld door het NCCLS, en de microdilutiemethode voorgesteld door het EUCAST. In deze methoden worden kuipjes van een microtiterplaat gevuld met oplossingen van AM in verschillende concentraties. Hieraan wordt vervolgens een gestandaardiseerd inoculum toegevoegd. Het plaatje wordt geïncubeerd en tenslotte wordt de groei turbidimetrisch (via spectrofotometrie) bepaald.

3.2.2. Materialen en methoden

3.2.2.1. Isolaten

De in vitro gevoeligheden van 93 reine isolaten, waaronder *C. albicans* (n= 36), *C. glabrata* (n= 17), *C. krusei* (n= 12), *C. tropicalis* (n= 8), *C. parapsilosis* (n= 8), *C. kefyr* (n= 4), *C. lusitaniae* (n= 2), *C. inconspicua* (n=1) en *Saccharomyces cerevisiae* (n=5), worden getest. Deze isolaten zijn afkomstig van de spraakprothesen (type PROVOX[®]) van 43 patiënten van de afdeling Hoofd- en Halschirurgie van het Universitair Ziekenhuis te Gent (zie 3.1.). Naast deze klinische isolaten worden ook 2 controlestammen, n.l. *C. krusei* ATCC 6258 en *C. parapsilosis* ATCC 90019, meegenomen in de analyses (Barry et al., 2000).

3.2.2.2. Antimycotica.

De volgende vijf AM worden gebruikt: fluconazol (Diflucan[®], Pfizer Inc., New York, NY, USA), miconazol (Alpha Pharma, Nazareth), nystatine (Alpha Pharma), terbinafine (Lamisil[®], Novartis international AG, Basel, Zwitserland) en voriconazol (Pfizer Inc.). Deze AM werden geselecteerd op basis van uit andere studies gekende gevoeligheden van *Candida* species isolaten (Sanglard, 2002; Bauters et al., 2002). Fluconazol, nystatine en voriconazol worden bewaard bij 4°C, terbinafine en miconazol bij kamertemperatuur. Stockoplossingen van miconazol en nystatine worden bereid door 32 mg op te lossen in 10 ml dimethylsulfoxide (DMSO). Daarna wordt deze stockoplossing van 3.2 g/l uitgevuld in buisjes van 1 ml en bewaard bij -80°C tot gebruik. De oplossingen van nystatine worden

afgeschermd van het licht. Terbinafine wordt opgelost in DMSO + 5% Tween 80 in een concentratie van 6.4 mg/l. Voriconazol wordt eerst opgelost in 1 ml dimethylformamide en deze oplossing wordt daarna aangelengd met 9 ml steriel water tot een stockoplossing van 3.2 g/l wordt bekomen. Fluconazol wordt opgelost in steriel gedestilleerd water en gesteriliseerd door middel van filtratie (celluloseacetaat, 0.22 μ m, Corning, New York, USA).

3.2.2.3. Groeimedia

Er wordt gebruik gemaakt van een RPMI 1640 bouillon met glutamine en zonder bicarbonaat (BD). Het medium wordt gebufferd met 3-(N-morfolino) propaansulfonzuur (0.165 M) tot pH 7.0. Het geheel wordt gesteriliseerd door middel van filtratie (celluloseacetaat, 0.22 μ m) en bewaard bij 4°C tot gebruik.

De glucoseconcentratie bij de EUCAST-methode bedraagt, na supplementatie, 2% in plaats van de oorspronkelijke 0.2% om de groei van de gisten te stimuleren. Daarenboven wordt bij EUCAST het medium in dubbele sterkte bereid om bij toevoeging van het inoculum in de microtiterplaatjes de gewenste antimycoticum-concentratie te bereiken (zie verder).

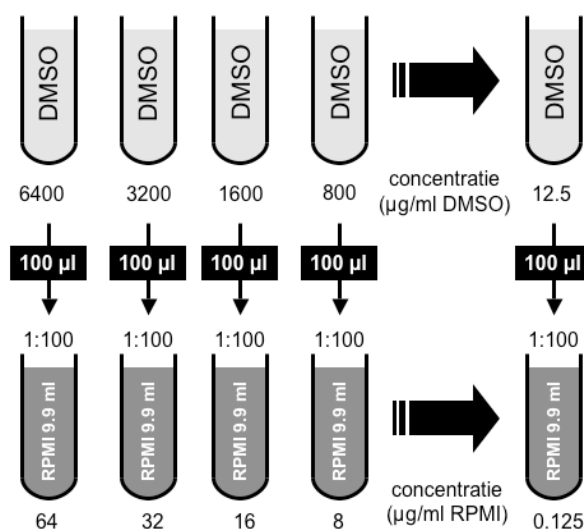
3.2.2.4. Microtiterplaten

Voor de NCCLS-methode worden steriele 96-well microtiterplaten met U-vormige kuipjes aangewend (TPP, Trasadingen, Zwitserland). Voor de EUCAST-methode worden 96-well microtiterplaten met platte bodem gebruikt (TPP).

3.2.2.5. Procedures

3.2.2.5.1. Verdunningsreeksen

Voor de NCCLS- en EUCAST-methoden worden, uitgaande van de stockoplossingen van de AM, reeksen van respectievelijk 11 en 10 seriële 1:2 verdunningen bereid volgens de richtlijnen van de respectievelijke instanties (NCCLS M27-A, EUCAST-AFST) (Fig. 2.7.).



Figuur 2.7. Schematische voorstelling van de bereiding van een verdunningsreeks van nystatine volgens de richtlijnen van het EUCAST (naar EUCAST-AFST)

3.2.2.5.2. Vullen van de microtiterplaten

Voor de NCCLS-methode wordt in elke kolom van het microtiterplaatje 100 µl van een bepaalde concentratie van het antimycoticum gebracht. Naast de verdunningsreeks wordt telkens een kolom voor een groeiconrole (= groeimedium zonder antimycoticum) voorbehouden. De plaatjes worden bij -80°C ingevroren en op de dag van de test ontdooid (30 min). Vervolgens wordt 100 µl inoculumsuspensie in elk kuipje van de verdunningsreeks gebracht, evenals in de kolom van de groeiconrole. Het totaal volume in alle kuipjes bedraagt 200 µl.

Bij de EUCAST-methode wordt gewerkt zoals wordt beschreven voor de NCCLS-methode. Hier wordt echter telkens een kolom voorbehouden als steriliteitcontrole. Deze kolom bevat 100 µl groeimedium en wordt op de dag van de inoculatie verder gevuld met 100 µl steriel gedestilleerd water.

3.2.2.5.3. *Bereiding van de inocula*

Voor de NCCLS-methode worden de inocula bereid uitgaande van een 18-24 uur oude cultuur op SDA. Er wordt een suspensie gemaakt van de cultuur in steriel fysiologisch water (FW). Het inoculum wordt spectrofotometrisch (Spectronic 20+, Milton Roy, Ivyland, PA, USA) gestandaardiseerd, waarbij de suspensie wordt verdund tot de optische densiteit (OD) bij 530 nm 0.11 à 0.12 bedraagt ($1-5 \times 10^6$ KVE/ml). Na een 1:50 en een 1:20 verdunning in het groeimedium, wordt een werksuspensie van $1-5 \times 10^3$ KVE/ml bekomen. Na inoculatie van de plaatjes is de finale concentratie $0.5-2.5 \times 10^3$ KVE/ml.

Bij de EUCAST-methode wordt gewerkt zoals bij de NCCLS-methode. De gestandaardiseerde suspensie wordt echter gemaakt in steriel gedestilleerd water. Daarna volgt een 1:10 verdunning in steriel gedestilleerd water zodat een werksuspensie van $1-5 \times 10^5$ KVE/ml wordt bekomen. Na inoculatie van de plaatjes is de finale concentratie $0.5-2.5 \times 10^5$ KVE/ml.

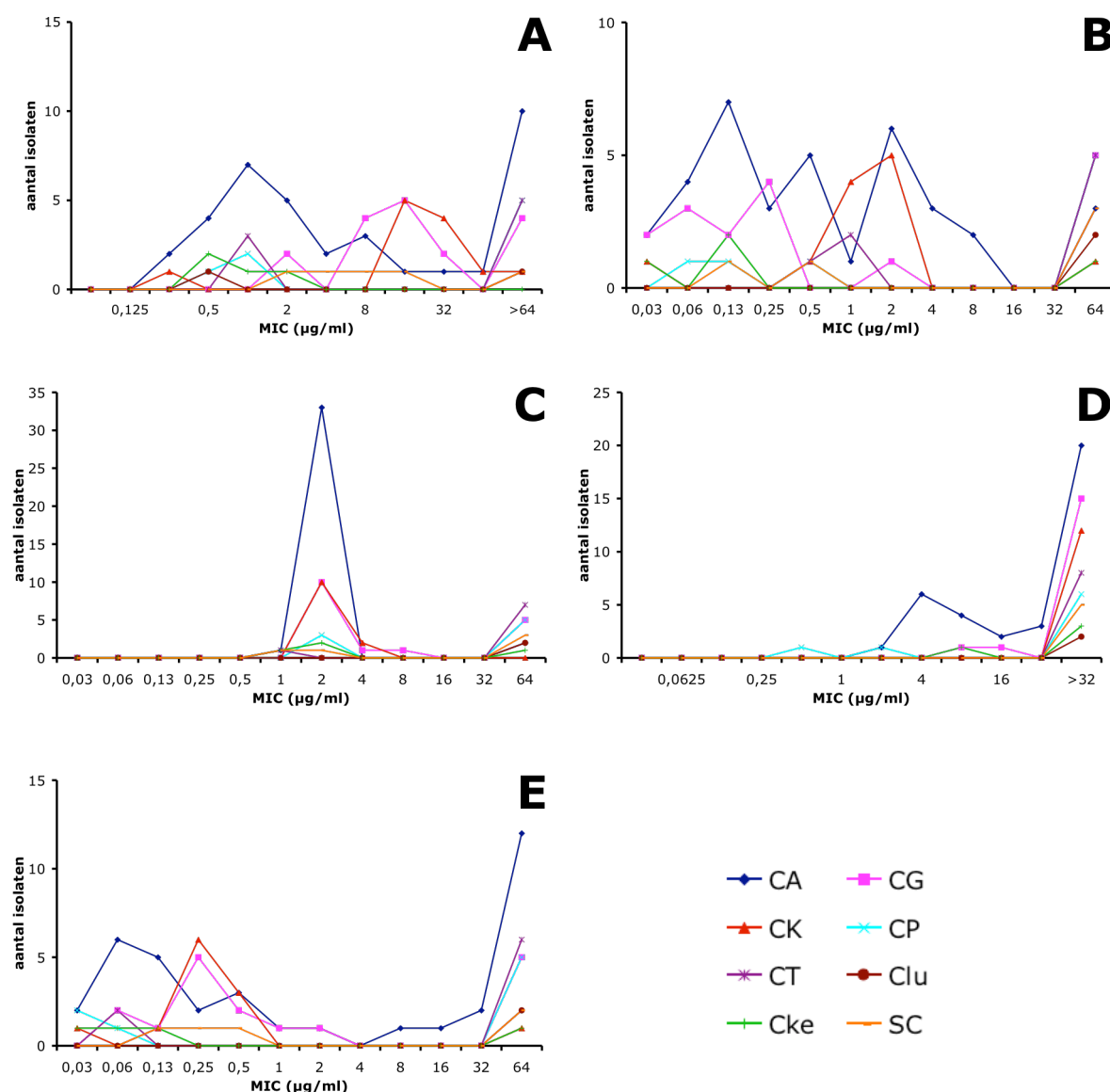
3.2.2.5.4. *Bepaling van het eindpunt*

Bij de NCCLS-methode wordt de groei in elk kuipje na 24 uur (voorlopige aflezing) en 48 uur (definitieve aflezing) incubatie bij 37°C bepaald door de absorptie (turbiditeit) van de kuipjes bij 690 nm te meten met behulp van een microtiterplaatlezer (Victor², PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA). De MIC 80% is de laagste concentratie aan antimycoticum die een absorptiewaarde $\leq 80\%$ van de groeicontrôle geeft.

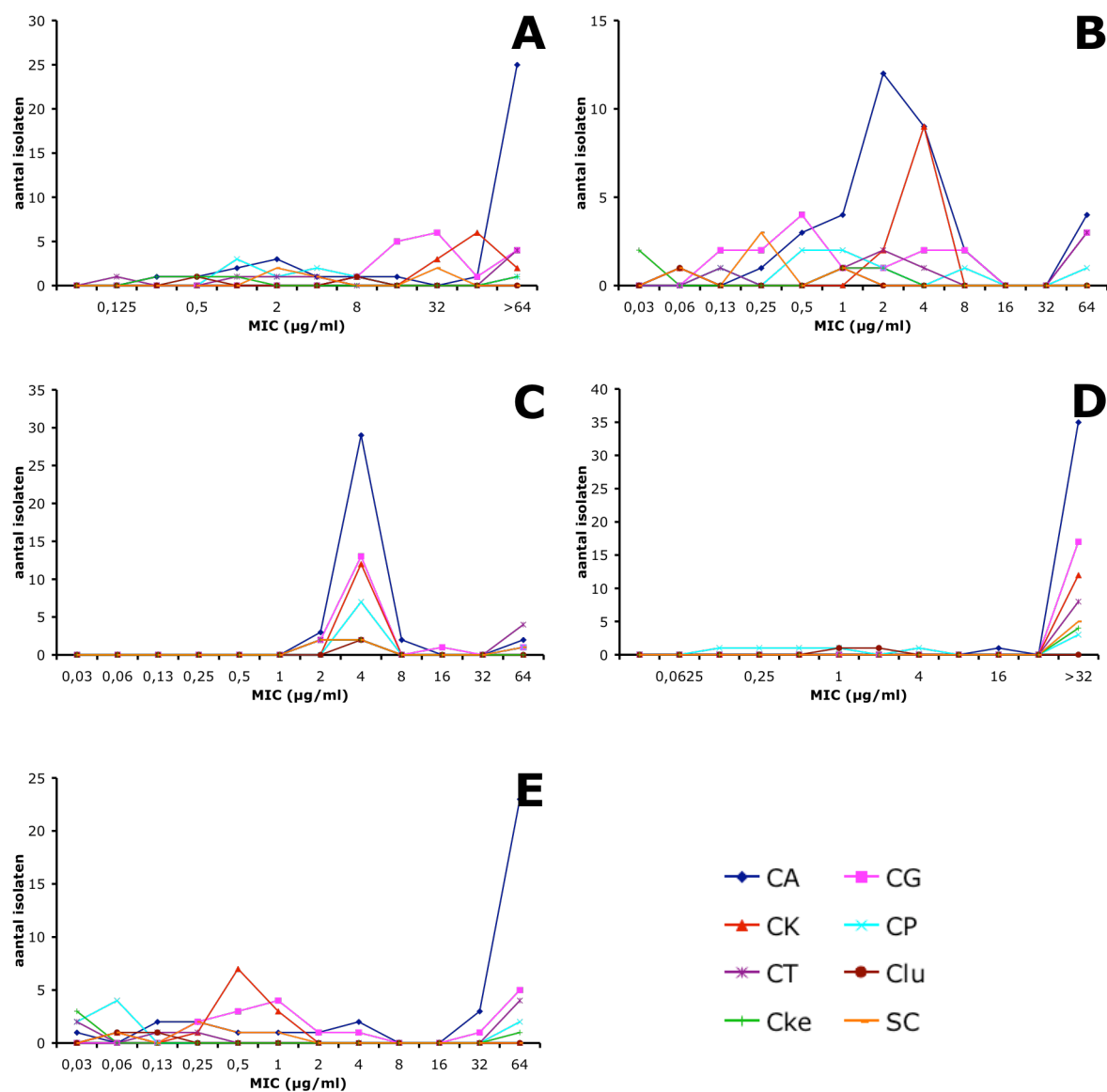
Voor de EUCAST-methode wordt de groei na 24 uur incubatie bij 37°C via absorptiemetingen bij 530 nm bepaald. Indien de optische densiteit van de groeicontrôle na 24 uur kleiner is dan 0.5, wordt het plaatje 12 tot 24 uur langer geïncubeerd en wordt er opnieuw gemeten. Wanneer de absorptiewaarde niet boven de 0.5 uitstijgt, moet de test opnieuw worden uitgevoerd. De MIC 50% is hier de laagste concentratie aan antimycoticum die een absorptie $\leq 50\%$ van de groeicontrôle oplevert.

3.2.3. Resultaten

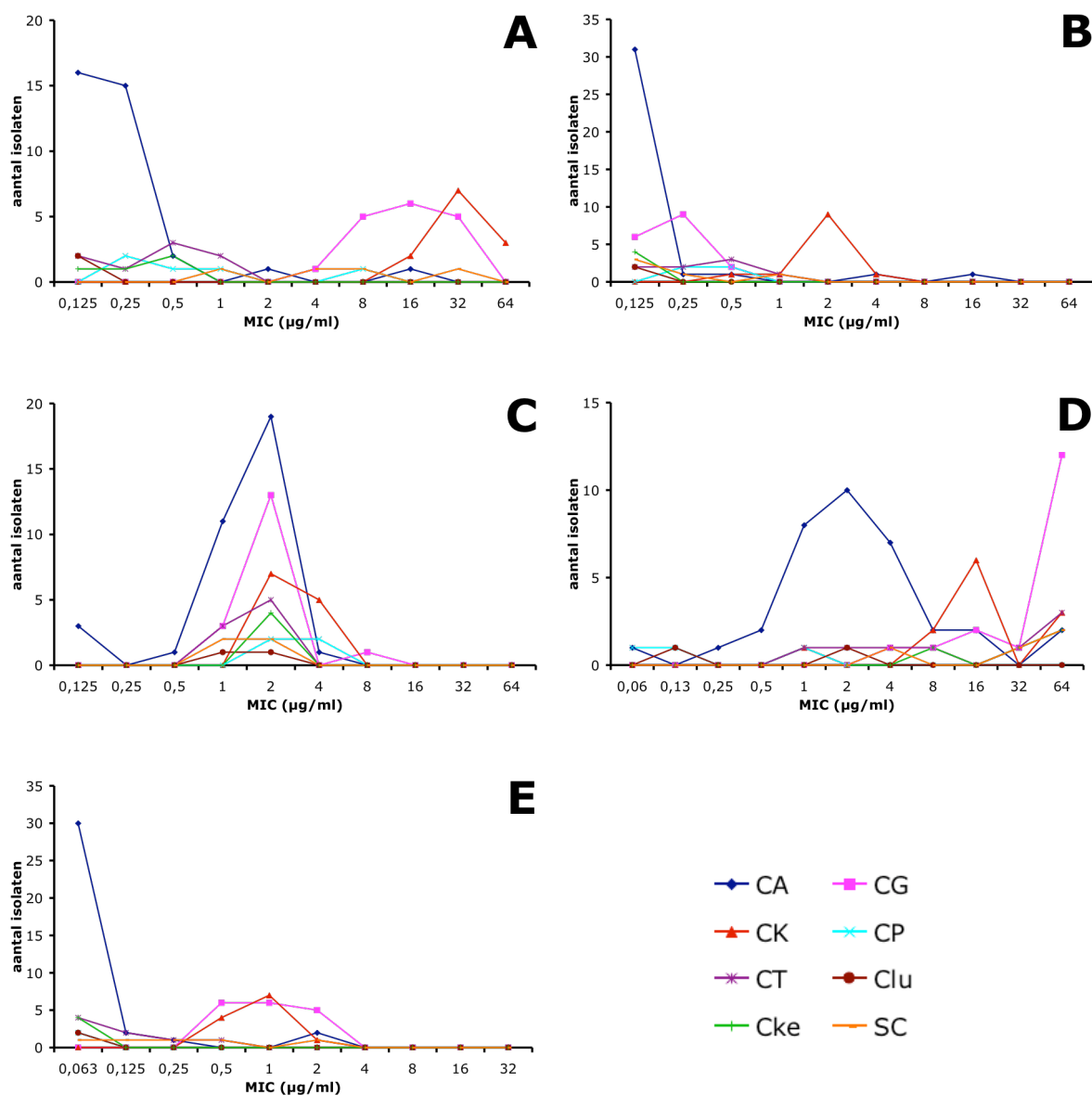
De resultaten met betrekking tot de susceptibiliteit van de eerder vermelde isolaten (3.2.2.1) voor 5 AM (3.2.2.2), bekomen met de NCCLS- en EUCAST-methoden, worden voorgesteld in de Fig. 2.8-2.10. Voor elk antimycoticum wordt het aantal isolaten (Y-as) weergegeven dat een bepaalde MIC-waarde (X-as) vertoont. Voor het *C. inconspicua* isolaat wordt met beide methoden geen MIC bekomen.



Figuur 2.8. Aantal isolaten (behorend tot 8 species) in functie van hun MIC, voor respectievelijk A: fluconazol, B: miconazol, C: nystatine, D: terbinafine en E: voriconazol, bepaald via de NCCLS-methode afgelezen na 24 uur, CA= *C. albicans*, CG= *C. glabrata*, CK= *C. krusei*, CT= *C. tropicalis*, CP= *C. parapsilosis*, Cke= *C. kefyr*, Clu= *C. lusitaniae*, SC= *S. cerevisiae*.



Figuur 2.9. Aantal isolaten (behorend tot 8 species) in functie van hun MIC, voor respectievelijk A: fluconazol, B: miconazol, C: nystatine, D: terbinafine en E: voriconazol bepaald via de NCCLS-methode met aflezing na 48 uur. Afkortingen van de species, zie Fig. 2.8.



Figuur 2.10. Aantal isolaten (behorend tot 8 species) in functie van hun MIC, voor respectievelijk A: fluconazol, B: miconazol, C: nystatine, D: terbinafine en E: voriconazol, bepaald via de EUCAST-methode. Afkortingen van de species, zie Fig. 2.8.

3.2.4. Bespreking

De bekomen MIC-waarden worden hier niet geïnterpreteerd in het licht van een therapeutisch effect bij een infectie door de diverse species, maar eerder van het potentieel van een antimycoticum voor incorporatie in polysiloxaan. De belangrijkste vereiste is dan ook een nauwe distributie van MIC-waarden, wat een uniforme gevoeligheid van “alle” TSP-koloniserende *Candida* spp. zou suggereren. Daarnaast is het, met het oog op verwerking van een bij voorkeur lage, niet-toxische concentratie van het antimycoticum in polysiloxaan, belangrijk dat de gemiddelde MIC-waarde laag ligt.

Uit de resultaten blijkt dat voor alle species volgens de twee methoden (NCCLS en EUCAST) de grootste fractie isolaten voor nystatine de meest nauwe distributie van MIC-waarden vertonen. Daarenboven liggen de MIC-waarden voor nystatine rond een lage concentratie van 2-4 µg/ml. De MIC-waarden voor miconazol zijn meer gespreid dan die van nystatine, maar de meeste zijn wel laag. Fluconazol en voriconazol geven een veel bredere spreiding van MIC-waarden en de MIC-waarden van terbinafine liggen voor de meeste species hoog. De bekomen resultaten zijn in overeenstemming met wat door Bauters et al. (2002) over de susceptibiliteit van TSP isolaten werd gerapporteerd.

3.2.5. Besluit

Op basis van de resultaten van de susceptibiliteitsbepalingen kan worden besloten dat nystatine het beste kandidaat-antimycoticum is voor de incorporatie in polysiloxaan. Miconazol wordt als tweede weerhouden. Een bijkomend voordeel van deze AM is hun lage opname in het bloed, wat bij implantatie van met deze AM opgeladen materialen de systemische concentraties wellicht beperkt zal houden. Dit zou het voorkomen van eventuele nevenwerkingen kunnen verminderen.

4. SYSTEMEN VOOR IN VITRO BIOFILMVORMING DOOR *C. ALBICANS*

De ontwikkeling van modelsystemen voor de studie van biofilmgroei door *C. albicans* omvat twee aspecten. Ten eerste worden een aantal systemen/procedures getest om biofilms op een reproduceerbare manier te kweken (4.2.). Ten tweede dienen methoden te worden geëvalueerd voor de kwantificatie van de biofilmbiomassa, teneinde de resultaten van de kweekexperimenten te beoordelen. De validatie van de kwantificatietechnieken gebeurt initieel op planktonische cellen (4.1.) en nadien op de biofilms zelf (4.3.).

4.1. KWANTIFICATIE VAN PLANKTONISCHE CELLEN

4.1.1. Principe

In de hiernavolgende experimenten wordt telkens een verdunningsreeks van gistcellen gemaakt, waarna het aantal cellen in elke verdunning wordt bepaald via de plaatgietmethode en met behulp van een “surrogaat”-assay. In het tweede geval worden fracties van iedere verdunning in een microtiterplaat gebracht, waarna er aan ieder kuipje eenzelfde hoeveelheid enzymsubstraat (XTT of FDA) of fluorochroom (SYTO[®] 9) wordt toegevoegd. Na incubatie wordt de ontstane fluorescentie of kleur in ieder kuipje gemeten met behulp van een microtiterplaatlezer.

Voor de “surrogaat”-assays wordt het lineair bereik van de responscurven (absorptie of fluorescentie in functie van het aantal cellen) nagegaan. Het aantal cellen wordt via uitplating bepaald. Daarnaast worden binnen het lineaire bereik van de responscurven de intra- en interspecies variaties statistisch geëvalueerd.

4.1.2. Materialen en methoden

4.1.2.1. Isolaten

In alle experimenten wordt gewerkt met 3 *C. albicans* (CA25, CA35, CA36) en 3 *C. parapsilosis* (CP9, CP44, CP61) isolaten. Deze zijn afkomstig van spraakprothesen die enkel met 1 isolaat waren gekoloniseerd. Na overnacht incubatie bij 37°C van 6 (12 voor het XTT assay) centrifugeerbuisjes met 10 ml geënte Sabouraud Dextrose bouillon (SDB, BD) worden de cellen geoogst door middel van centrifugatie (4 min, 4000 rpm). De “pellet” wordt driemaal gewassen met het medium waarmee in de desbetreffende procedure wordt gewerkt, n.l. FW of steriele fysiologische fosfaatbuffer (PBS, 10 mM, pH 7.0). Vervolgens worden de cellen gehersuspendeerd in 1 ml van het gebruikte medium. De inhoud van alle

6 (12) buisjes wordt samengevoegd, wat resulteert in de start suspensie. Deze laatste wordt vervolgens 9 maal 1:10 verdund in het gebruikte medium. Uiteindelijk wordt een verdunningsreeks van 10^{-1} tot 10^{-10} van de start suspensie bekomen. Een buisje met 9 ml van het gebruikte medium fungeert als controle bij ieder assay.

4.1.2.2. Kwantificatietechnieken

4.1.2.2.1. *Uitplating*

Na het opstellen van de verdunningsreeks wordt 1 ml van de laatste 5 verdunningen via de plaatgietmethode uitgeplaat op SDA. De platen worden 24 uur geïncubeerd bij 37°C in het geval van *C. albicans* en 48 uur voor *C. parapsilosis*. Vervolgens worden de kolonies op iedere plaat geteld.

4.1.2.2.2. *XTT-assay*

In het XTT-assay (naar Kuhn et al., 2003) wordt in de kuipjes van een weefselcultuurplaat met 24 kuipjes (TPP) (in drievoud) 2.5 ml van iedere verdunning in PBS gebracht. Daarnaast worden ook drie kuipjes gevuld met 2.5 ml PBS. Aan iedere kuipje wordt vervolgens 54 µl van een mengsel van 50 µl XTT (Sigma, St. Louis, MO, USA) stockoplossing (1 mg/ml voorverwarmde PBS) en 4 µl menadione (Sigma) stockoplossing (17.22 mg/100 ml aceton) toegevoegd. Menadione is een katalysator van de reductie van XTT tot formazan (Baillie en Douglas, 1999). Na vijf uur incubatie bij 37°C wordt 1 ml uit de kuipjes overgebracht in eppendorfbuisjes en gecentrifugeerd (4 min, 12000 rpm) om de aanwezige cellen te verwijderen. Van het supernatans wordt 200 µl in een kuipje van een nieuwe microtiterplaat (weefselcultuurplaat met 96 kuipjes, TPP) gebracht, waarna de absorptie van de kuipjes wordt gemeten met de Victor² microtiterplaatlezer bij een golflengte van 486 ±10 nm.

4.1.2.2.3. *FDA-assay*

In het FDA-assay (naar De Rosa et al., 1998) wordt (voor 3 rijen) telkens 100 µl van een verdunning in PBS in de eerste 10 kuipjes van een rij van een zwarte microtiterplaat met 96 kuipjes (CultureplateTM 96-F, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences) gebracht. In het laatste kuipje van iedere rij wordt 100 µl PBS gebracht. Aan alle kuipjes wordt vervolgens 100 µl van een 1:25 verdunning van een FDA (Sigma) stockoplossing (2 mg/ml aceton) in PBS toegevoegd. Na 1 uur incubatie bij 37°C in een gethermostatiseerde microtiterplaatschudder (Titramax 1000 met incubator 1000 module, Heidolph instruments,

Cinnaminson, NJ, USA) in het donker, wordt de fluorescentie gemeten met behulp van een microtiterplaatlezer bij een excitatie- en emissiegolflengte van respectievelijk 486 ± 10 en 535 ± 25 nm.

4.1.2.2.4. SYTO[®] 9-assay

In het SYTO[®] 9-assay worden zwarte microtiterplaten met 96 kuipjes gevuld met de verdunningen in FW, zoals beschreven in 4.1.2.2.3. Vervolgens wordt aan ieder kuipje 100 μ l van een 1:500 verdunning van een SYTO[®] 9 oplossing (5 mM in DMSO, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in FW toegevoegd. Na 15 min incubatie bij 37°C in de microtiterplaatschudder in het donker, wordt de fluorescentie in de kuipjes gemeten met de microtiterplaatlezer bij een excitatie- en emissiegolflengte van respectievelijk 486 ± 10 en 535 ± 25 nm.

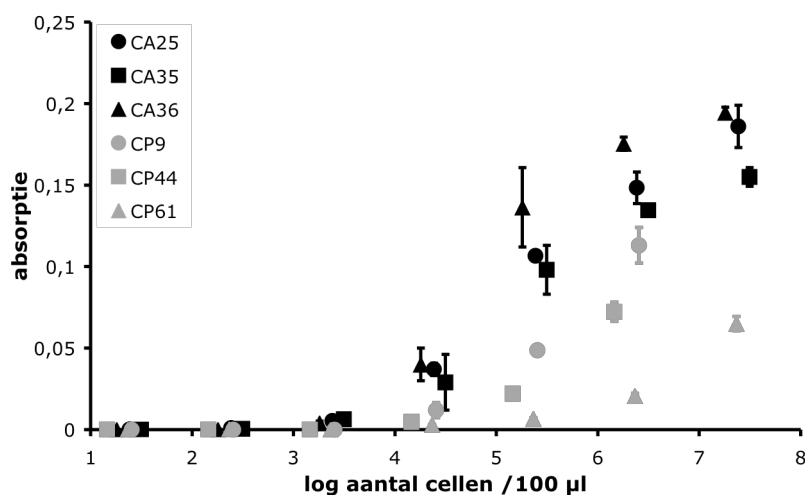
4.1.2.3. Statistische analyse

Binnen de visueel-geschatte lineaire bereiken van de responscurven van de drie assays worden de invloeden van “cellen” (toenemend aantal cellen, bepaald via uitplating), “species” (*C. albicans* of *C. parapsilosis*) en “stam” (CA25, CA35, CA36, CP9, CP44, CP61) op de respons met behulp van lineaire regressie, een UNIANOVA statistiek en SPSS 11.0 software geëvalueerd (Armstrong en Hilton, 2004). De continue predictor “cellen” wordt in het statistisch model geïntroduceerd als covariate, terwijl de categorische predictoren “species” en “stam” respectievelijk, als een “fixed” en “random” factor (binnen “species”) worden opgenomen (Armstrong et al, 2002). Het “General Linear Model” (GLM) wordt eerst gefit met de hoofdeffecten van de drie predictoren, 2 tweewegs-interactietermen (“species” x “cellen” en “species” x “stam”) en de driewegs-interactieterm. Stapsgewijs worden niet-significante interactietermen ($P > 0.05$) verwijderd, waarna het aangepaste model telkens opnieuw op de data wordt toegepast. Om een variatiecoëfficiënt (VC) te berekenen per methode wordt de vierkantswortel van de “Residual Mean Squared Error” (RMSE) gedeeld door de overeenkomstige “Grand Mean” (GM).

4.1.3. Resultaten

4.1.3.1. Het XTT-assay

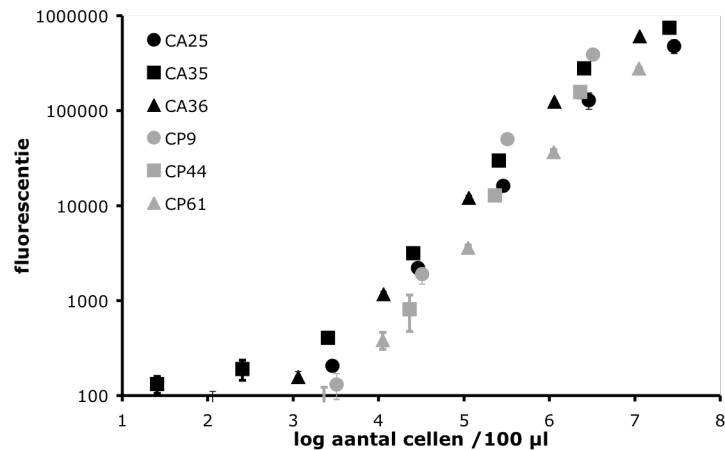
In Fig. 4.1. wordt de absorptie in functie van het log aantal cellen voor *C. albicans* (CA25, CA35 en CA36) en *C. parapsilosis* (CP9, CP44 en CP61) weergegeven. Het lineair bereik van dit assay strekt zich naar schatting uit van 4.5 tot 7.5 log aantal cellen. Uit de statistische analyse blijken de driewegs-interactieterm en de “species” x “cellen” interactieterm niet significant, zij worden dan ook uit het model genomen. De resterende interactieterm “species” x “stam” is wel significant ($P < 0.01$), wat er op wijst dat de variatie in respons van de verschillende stammen verschilt tussen de twee species. Daarnaast hebben zowel de factor “stam” als de factor “species” een significante invloed op de respons, met P -waarden lager dan respectievelijk 0.05 en 0.01. De VC van het XTT-assay bedraagt 20.3%.



Figuur 4.1. Absorptie in functie van het log aantal cellen voor 3 *C. albicans* en 3 *C. parapsilosis* stammen in het XTT-assay

4.1.3.2. Het FDA-assay

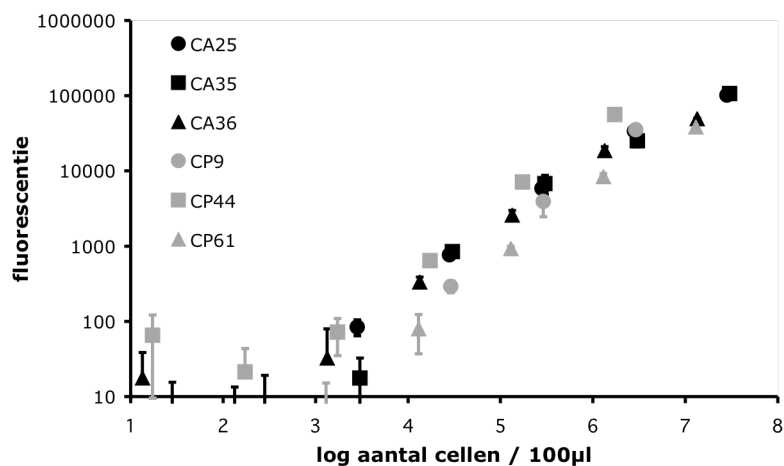
De fluorescentie wordt logaritmisch in functie van het log aantal *C. albicans* (CA25, CA35 en CA36) en *C. parapsilosis* (CP9, CP44 en CP61) cellen weergegeven in Fig. 4.2. Het lineair bereik van het FDA-assay ligt naar schatting tussen 3.5 en 7.5 log aantal cellen. Uit de UNIANOVA analyse blijkt dat de driewegs-interactieterm significant is ($P < 0.01$), wat erop wijst dat de variatie in respons van de verschillende stammen, in helling en snijpunt, zélf verschilt tussen de twee species. Daarenboven volgt uit de statistische analyse dat het effect van “species” zeer significant is bij een gemiddeld aantal cellen. De VC van het FDA-assay is 3.1%.



Figuur 4.2. Fluorescentierespons in functie van het log aantal cellen voor 3 *C. albicans* en 3 *C. parapsilosis* stammen in het FDA-assay

4.1.3.3. Het SYTO[®] 9-assay

In Fig. 4.3. wordt de fluorescentierespons logaritmisch in functie van het log aantal *C. albicans* (CA25, CA35 en CA36) en *C. parapsilosis* (CP9, CP44 en CP61) cellen voorgesteld. Het lineair bereik van het SYTO[®] 9-assay beslaat naar schatting een interval van 3 tot 7 log aantal cellen. Uit de UNIANOVA blijkt dat, net zoals bij het XTT assay, de drieweg-interactieterm en de “species” x “cellen” interactieterm niet significant zijn, zij worden dus uit het model genomen. De interactieterm “species” x “stam” daarentegen is wel significant ($P < 0.01$), wat opnieuw wijst op een verschil in variatie van de respons van de verschillende stammen tussen de twee species. Daarenboven heeft de predictor “species” geen significante invloed op de respons, terwijl de predictor “cellen” dit wel heeft ($P < 0.01$). De VC van het SYTO[®] 9-assay is 14.9%.



Figuur 4.3. Fluorescentierespons in functie van het log aantal cellen voor 3 *C. albicans* en 3 *C. parapsilosis* stammen in het SYTO[®] 9-assay

4.1.4. Bespreking

Het XTT- en het FDA-assay meten een metabole activiteit in leefbare, maar niet noodzakelijk kweekbare cellen. De fluorescentie bekomen na binding van het fluorochroom SYTO[®] 9 is afkomstig van zowel levende als dode cellen. Een voorwaarde voor het praktisch nut van deze assays is dat hun responsen evenredig zijn met het aantal cellen. Het is dus belangrijk om het lineair bereik van de responscurven (absorptie of fluorescentie versus log aantal cellen, bepaald door uitplating) te bepalen.

Het lineair bereik van het XTT-assay ($10^{4.5}$ tot $10^{7.5}$ cellen) komt quasi overeen met het lineair bereik gerapporteerd door Tellier et al. (1992) (10^5 tot 10^7 cellen). Deze laatsten zetten wel absorptie uit in functie van het absolute aantal cellen, in plaats van, zoals in ons werk, het log aantal cellen. Kuhn et al. (2003) zetten de absorpties wel uit in functie van het log aantal cellen, maar uit de responscurven kan geen duidelijk lineair bereik worden afgeleid. Uit de resultaten in ons werk blijkt ook dat binnen het lineair bereik van de responscurven het assay onderhevig is aan intra- en interspeciesvariatie, wat in onverenstemming is met de bevindingen van Kuhn et al. (2003).

Het lineair bereik van het FDA-assay overspant een interval van ongeveer $10^{3.5}$ tot $10^{7.5}$ aantal cellen. Wanneer de responscurven statistisch worden vergeleken, suggereert de significante driewegs-interactieterm in het model een verschil in helling en snijpunt binnen het lineair bereik van de responscurven voor de verschillende stammen. Nochtans wijst de lage VC erop dat, hoewel er significante verschillen zijn in respons tussen stammen, species en hun interacties met “cellen”, de variatie in respons voor een stam zeer laag is. Dit wijst erop dat het assay uitermate gevoelig is aan kleine verschillen in bvb. esterase-activiteit, opname van het substraat, efflux van het fluoresceïne,... Het FDA-assay kan daarom als “gevoeliger” dan uitplating worden bestempeld, die zelf alleen verschillen in het aantal kweekbare cellen kan aantonen.

Het SYTO[®] 9-assay, met een lineair bereik van 10^3 tot 10^7 cellen, is gevoelig aan verschillen tussen stammen, maar niet tussen species. Een hogere VC kan een mogelijke verklaring voor dit fenomeen zijn.

4.2. EVALUATIE VAN 3 IN VITRO BIOFILMSYSTEMEN

4.2.1. Principe

In dit werk worden drie systemen voor de in vitro kweek van gistbiofilms gebruikt, n.l. een statisch systeem in microtiterplaten, de MRDs en de recent ontwikkelde CDC (Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA) biofilmreactor (Donlan et al., 2004; Goeres et al., 2005). De hiermee gegroeide biofilms worden gekwantificeerd met behulp van uitplating en het FDA-assay, waarna de bekomen resultaten in de verschillende systemen statistisch worden vergeleken.

4.2.2. Materialen en methoden

4.2.2.1. Stam

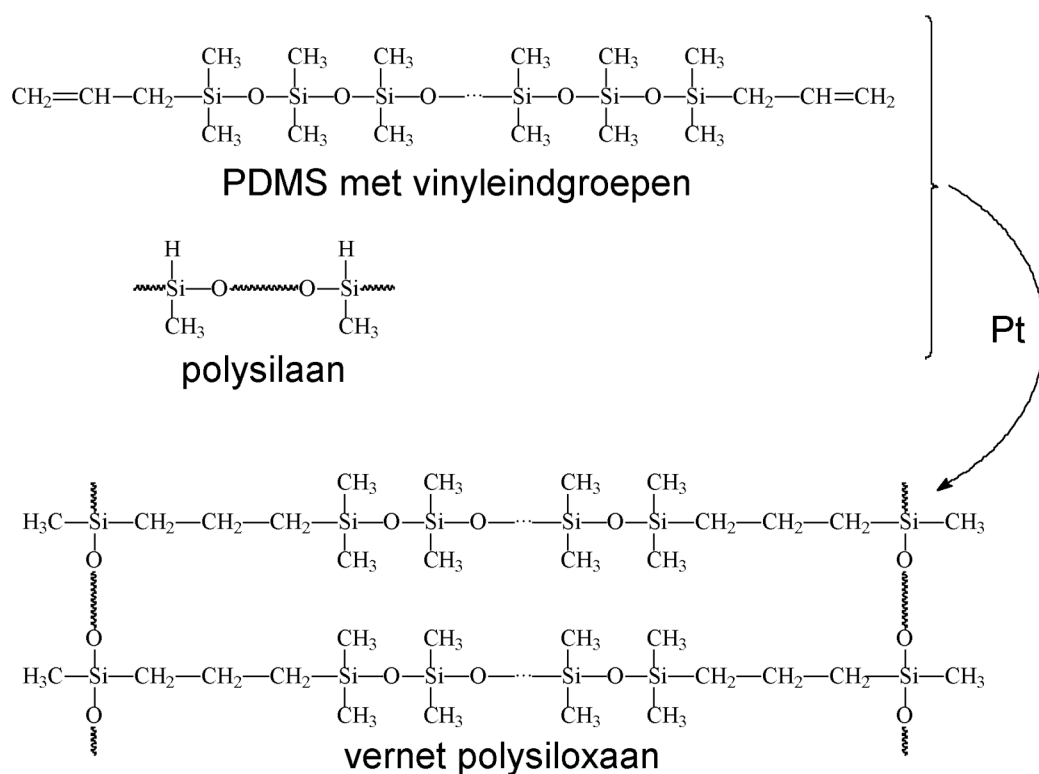
In alle experimenten wordt een *C. albicans* SC5314 (ATCC MYA-2876) stam gebruikt (Fonzi en Irwin, 1993). Deze stam wordt bewaard bij -80°C met behulp van het Microbank systeem (Prolab diagnostics, Austin, TX, USA) en telkens vers opgekweekt op SDA.

4.2.2.2. Groeimedia

Als inoculatiemedium wordt FW gebruikt. De groeimedia zijn verdunningen van Yeast Nitrogen Base (BD), gesupplementeerd met 50 mM glucose (= YNBG) (Baillie en Douglas, 1999; Jin et al., 2004). Het maken van verdunningsreeksen en de uitplating gebeuren respectievelijk in SDB en op SDA.

4.2.2.3. Siliconenschijfjes

Er worden schijfjes gemaakt van hetzelfde siliconenmateriaal, nl. polysiloxaan, waaruit ook de spraakprothesen vervaardigd zijn. Polysiloxanen zijn de meest voorkomende en één van de belangrijkste organosiliconenpolymeren die worden gebruikt in de polymeerindustrie, voornamelijk omwille van hun flexibiliteit, permeabiliteit voor gassen, lage glastransitietemperatuur (-127°C voor polydimethylsiloxaan), biocompatibiliteit, duurzaamheid en lage oppervlakenergie. Ook de gemakkelijke productie en lage kostprijs spelen een rol bij de keuze van dit materiaal. Het vernet polysiloxaan wordt bekomen door crosslinking via additie. Hiertoe worden twee componenten, polydimethylsiloxaan (PDMS) met vinyleindgroepen en een polysilaan, gemengd in aanwezigheid van een Pt-katalysator. Bij verwarmen ontstaat een polysiloxaannetwerk (Fig. 4.4).



Figuur 4.4. Reactie van PDMS met vinyleindgroepen en polysilaan tot vernet polysiloxaan

In dit werk worden siliconenvellen gemaakt uitgaande van een “medical-grade” siliconenrubber kit: Silastic Q7-4735 Biomedical grade ETR Elastomer kit (Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA). Delen A en B van de kit worden in gelijke hoeveelheden met behulp van een gekoelde walsmolen (Troester RZS4, Hannover, Duitsland) bij 25°C gemengd, waarna het mengsel in een roestvrij stalen matrijs voor het vervaardigen van vellen met een dikte van 2 mm wordt gebracht. Het siliconenmengsel wordt ge vulkaniseerd door de matrijs 10 min bij een temperatuur van 93°C en een druk van 200 bar te plaatsen (Fontijne pers SRA100, Fontijne Grotness Inc., Itasca, IL, USA). Met behulp van een metalen pons worden schijfjes uit deze ge vulkaniseerde siliconenvellen gedrukt. De geponste schijfjes worden vervolgens gewassen met 2% RBS 35 (Sigma) en afgespoeld met water (Busscher et al., 1997). De diameters van de schijfjes bedragen voor het statisch systeem, de MRDs en de CDC biofilmreactor respectievelijk, 10, 8 en 13 mm.

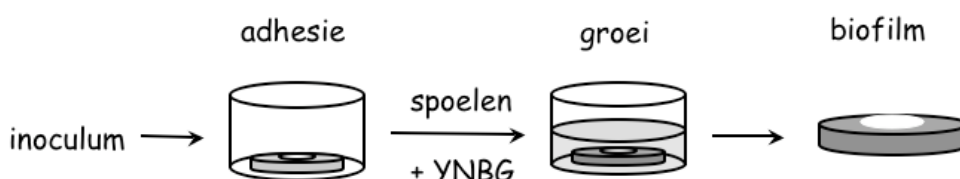
4.2.2.4. Modelsystemen

4.2.2.4.1. *Het statisch systeem*

In het statisch systeem worden biofilms in 24-well weefselcultuurplaten (TPP) gekweekt. Er worden twee runs, met telkens 12 schijfjes, uitgevoerd.

Eén kolonie van een 24 uur oude cultuur van SC5314 wordt gesuspendeerd in 10 ml YNBG en overnacht geïncubeerd bij 37°C. Na incubatie worden de cellen geoogst door middel van centrifugatie (4 min, 4000 rpm). De “pellet” wordt driemaal gewassen met 1 ml FW en gehersuspendeerd in 2 ml FW. De resulterende celsuspensie wordt spectrofotometrisch gestandaardiseerd, waarbij de OD bij een golflengte van 520 nm op 0.8 wordt gebracht. Deze gestandaardiseerde suspensie is het inoculum.

Twaalf siliconenschijfjes worden in de kuipjes van een steriele 24-well plaat gelegd en op ieder schijfje wordt 80 µl inoculum gebracht. Controles met 80 µl FW worden ook meegenomen in de runs. Het plaatje wordt vervolgens 1 uur geïncubeerd bij 37°C, wat de adhesiefase vertegenwoordigt (Fig. 4.5.).



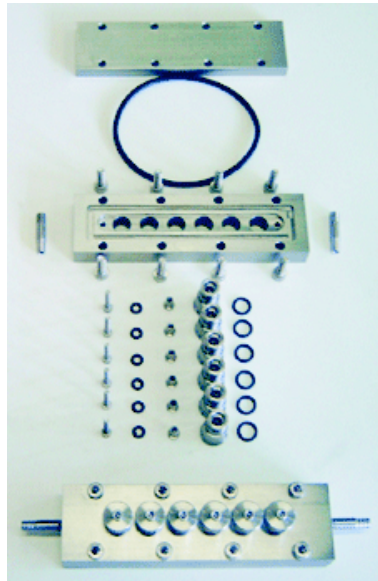
Figuur 4.5. Schematische voorstelling van het statisch biofilmsysteem

Na de adhesiefase worden de niet-geadheerde cellen verwijderd en wordt de premature biofilm driemaal gewassen met 1 ml PBS. Daarna worden de schijfjes overgebracht in een nieuwe 24-well plaat en wordt aan elk kuipje 1 ml YNBG toegevoegd. De plaatjes worden dan 24 uur geïncubeerd bij 37°C, waarna de schijfjes uit de microtiterplaat worden genomen om de gevormde biofilms te evalueren.

4.2.2.4.2. *De MRDs*

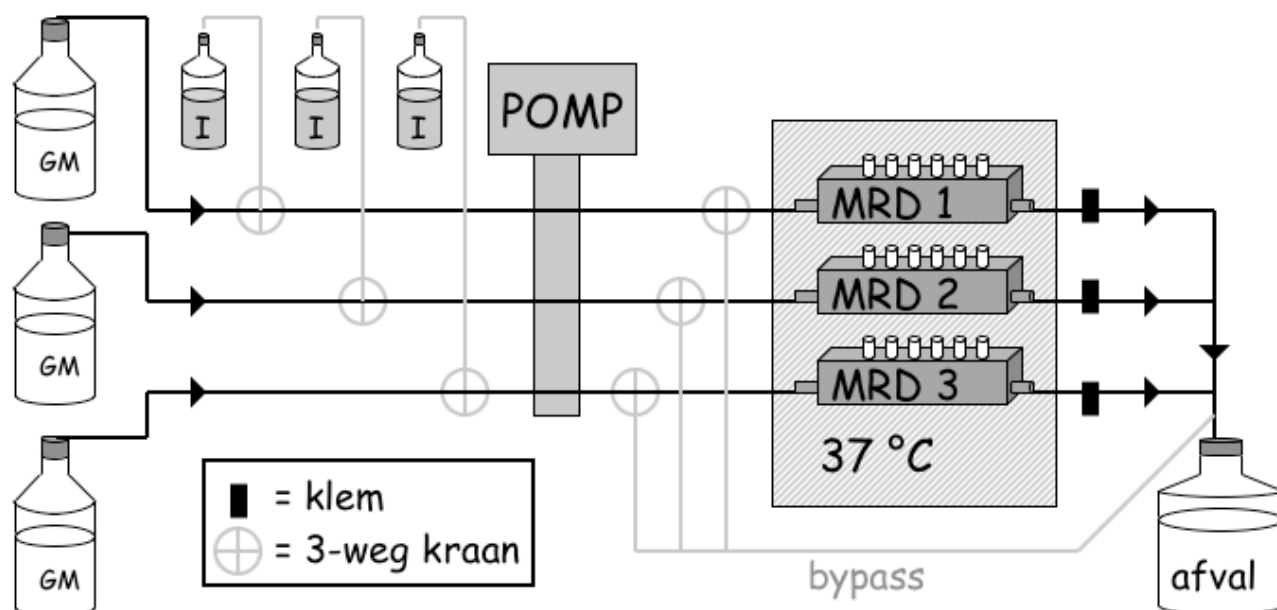
Drie zelfontworpen MRDs, geminiaturiseerde versies van commercieel beschikbare MRDs (zie Deel 2, 3.2.2.3.), ontwikkeld in samenwerking met de Centrale Werkplaats van de Faculteit Wetenschappen (Universiteit Gent), bevatten elk 6 openingen in een rechte lijn geplaatst boven een kanaal doorheen het toestel. In elke opening past een drukplug waarin een siliconenschijfje kan worden geplaatst (Fig. 4.6.). De toestellen zijn zo

gebouwd dat, na insertie, de schijfjes integraal deel uitmaken van de wand van het kanaal binnenin het toestel.



Figuur 4.6. Foto van een zelfontworpen MRD en de individuele componenten

Vóór elke run worden de leidingen, kraantjes en MRDs met elkaar verbonden, zoals voorgesteld in Fig. 4.7. Vervolgens worden de siliconenschijfjes in de plugs geplaatst en worden de 3 circuits geautoclaveerd. Nadien worden in een LAF-kast de leidingen op de verschillende media aangesloten. Tenslotte worden de geautoclaveerde MRDs in een op maat gemaakte aluminiummantel geplaatst (Centrale Werkplaats, Faculteit Wetenschappen, Universiteit Gent), die verbonden wordt met een cryostaat (Multitemp 2209, LKB, Bromma, Zweden) op 37°C. Finaal worden de leidingen doorheen de peristaltische pomp (Watson-Marlow 505 S, Bredel Inc., Welmington, MA, USA) geleid en wordt de afvalfles met de opstelling verbonden. Ieder circuit heeft een kraantje vóór en na de pomp. Het kraantje vóór de pomp dient om het inoculum of de groeimedia over het toestel te brengen. Het kraantje na de pomp dient als bypass om de lucht die in de leidingen zit uit te pompen en het resterende inoculum dat niet in de toestellen zit tijdens de adhesiefase uit de leidingen te spoelen.



Figuur 4.7. Schematische voorstelling van het MRD systeem, I= inoculum, GM= groeimeedium

Viermaal 10 ml SDB wordt geïnoculeerd met SC5314 en overnacht geïncubeerd bij 37°C. Na incubatie worden de cellen geoogst door middel van centrifugatie (4 min, 4000 rpm). De “pellet” wordt driemaal gewassen met 1 ml FW en gehersuspendeerd in 1 ml FW. De 4 suspensies worden samengevoegd en hiervan wordt 1 ml aan een fles met 199 ml steriel FW toegevoegd, wat het inoculum oplevert.

De 3 inocula worden aseptisch op de leidingen aangesloten (Fig. 4.7.) en de kraantjes worden zo gedraaid dat het inoculum (en de lucht uit de leidingen) door de toestellen wordt gepompt. Wanneer alle lucht uit de leidingen en toestellen is verwijderd en de toestellen met inoculum gevuld zijn, worden de klemmen na de MRDs dichtgedraaid. De toestellen worden omgekeerd (om de adhesie te bevorderen) en de kraantjes vóór de toestellen en vóór de pomp worden gedraaid om met behulp van de groeimedia de lucht en het resterend inoculum via de bypass uit de leidingen te spoelen. De adhesiefase duurt 1 uur, waarna de klemmen worden geopend, de toestellen terug omgedraaid worden en de tweede reeks kraantjes gedraaid wordt om de stroom van groeimedia te starten.

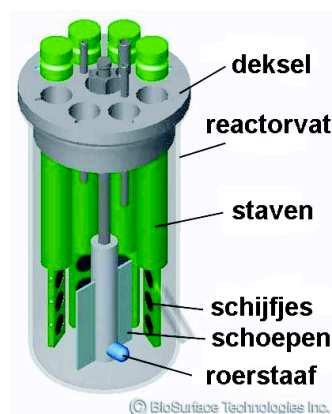
De groeimedia (YNBG) worden aan een debiet van 40 ml/uur doorheen de MRDs gepompt. Na 24 uur groeifase wordt de pomp gestopt en worden de plugs uit de toestellen gehaald. De siliconenschijfjes worden vervolgens uit de plugs genomen om de daarop aanwezige biofilms te evalueren. Fig. 4.8. is een foto van de opstelling. Er worden twee runs uitgevoerd.



Figuur 4.8. Foto van de MRD opstelling in het laboratorium

4.2.2.4.3. De CDC biofilmreactor

De CDC biofilmreactor (Biosurface Technologies Corporation, Bozeman, Montana, USA) bestaat uit een dubbelwandig glazen reactorvat met afvoer, een deksel met 8 polypropyleen staven, die onderaan elk 3 schijfjes kunnen vasthouden, en een teflon roereenheid. De staven worden in een kring in het deksel geplaatst zodat de schijfjes die er onderaan inzitten quasi een cirkel rond de roereenheid vormen (Fig. 4.9.). Deze roereenheid bestaat uit een teflon roerstaafje dat twee schoepen aandrijft. Wanneer de reactor op een magnetische roerplaat wordt gezet, zorgt de roereenheid voor een continue vloeistofstroom over de schijfjes. Het deksel van de reactor is ook voorzien van 3 uitgangspoorten die kunnen worden gebruikt voor de aanvoer van groeimedia, lucht of andere gassen. De dubbele wand zorgt, na aansluiting op een cryostaat, voor thermostatisatie van de reactor.



Figuur 4.9. Foto van een enkelwandige CDC biofilmreactor

In de 8 staven van de reactor worden 24 siliconenschijfjes, 3 per staaf, geplaatst. Twee uitgangspoorten van het deksel van de reactor worden voorzien van een siliconenbuisje dat met een ventfilter (Millex®-FG, Millipore, Bedford, MA, USA) wordt afgesloten. Op de derde uitgangspoort wordt een lange siliconenleiding geplaatst die via een peristaltische pomp (Watson-Marlow 505 S, Bredel Inc., Welington, MA, USA) wordt verbonden met de fles die het groeimedum bevat. De uitgangspoort van het reactorvat wordt via een siliconenleiding met een afvalfles verbonden. De reactor, met schijfjes, leidingen en ventfilters, wordt gesteriliseerd door middel van autoclaveren. Het groeimedum wordt afgevuld in een met droge hitte gesteriliseerde 10 liter fles in een LAF-kast. De reactor wordt geplaatst op een roereenheid (RET-Digivisc, IKA Labortechnik, Wilmington, MA, USA) en via de 2 poorten van de dubbele wand aangesloten op een cryostaat (Multitemp III, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Zweden). Deze stuurt vloeistof van 37°C doorheen de mantel rondom de reactor, zodat het geheel homogeen wordt verwarmd. In Fig. 4.10. is een foto van de opstelling weergegeven.



Figuur 4.10. Foto van de CDC biofilmreactor opstelling in het laboratorium

Tweemaal 10 ml SDB wordt geïnoculeerd met SC5314 en overnacht geïncubeerd bij 37°C. Vervolgens worden de cellen geoogst door middel van centrifugatie (4 min, 4000 rpm). De “pellet” wordt driemaal gewassen met 1 ml FW en gehersuspendeerd in 1 ml FW. Beide celsuspensies ($\pm 10^8$ cellen/ml) worden aan 500 ml YNBG toegevoegd, wat het inoculum oplevert.

Het inoculum wordt onder LAF-condities na afklemmen van de afvoerleiding in de steriele reactor gebracht. De gevulde reactor wordt vervolgens op de roereenheid geplaatst en aan de cryostaat gekoppeld. De roereenheid (80 rpm) en het bad worden aangeschakeld en de klem op de afvoerleiding wordt losgeschroefd. Deze inoculatiefase duurt 24 uur.

Na de inoculatiefase wordt de peristaltische pomp aangezet die het groeimedium, een 1:5 verdunning van YNBG, met een debiet van 400 ml/uur naar de reactor pompt. Na een eerste 24 uur groeifase wordt de fles met groeimedium vervangen door een nieuwe fles. Na 48 uur groei worden de pomp, het bad en de roereenheid gestopt en wordt de reactor naar de LAF-kast gebracht om de schijfjes uit de staven te halen en de erop aanwezige biofilms te evalueren. Met dit systeem worden eveneens twee runs uitgevoerd.

4.2.2.5. Evaluatie van de biofilmvorming

De biofilms op de schijfjes in de verschillende biofilmsystemen worden met behulp van twee van de eerder voorgestelde kwantificatietechnieken geëvalueerd, n.l. uitplaten en het FDA-assay. Bij ieder biofilmsysteem wordt per run de helft van de schijfjes gebruikt voor uitplating, terwijl de andere helft met het FDA-assay wordt geanalyseerd.

4.2.2.5.1. *Uitplating*

Om de biomassa in de biofilms te bepalen worden de schijfjes overgebracht in 10 ml SDB. De biofilmcellen worden vervolgens losgemaakt door de buisjes 3 maal afwisselend aan 10 s sonicatie (Branson 3510, 42 kHz, 100 watt, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA) en 10 s vortex-mixen (TM01, Labotech B.V, Ochten, Nederland) te onderwerpen (Heersink, 2003). Vervolgens worden de bekomen suspensies sequentieel 8 maal 1:10 uitverdund in SDB. Eén ml van de laatste 5 verdunningen wordt uitgeplaat op SDA. De platen worden 24 uur bij 37°C geïncubeerd, waarna het aantal kolonies op elke plaat wordt geteld. Hieruit kan, rekening houdend met de verdunningsfactoren, een schatting van het aantal KVE op de schijfjes worden gemaakt. De resultaten worden als “aantal cellen per schijfje” uitgedrukt, wat equivalent is met “aantal KVE per schijfje”.

4.2.2.5.2. *Het FDA-assay*

Voor het FDA-assay worden de schijfjes in een zwarte microtiterplaat met 24 kuipjes gebracht (Cultureplate™ 24-F, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences). Aan ieder kuipje worden achtereenvolgens 1 ml PBS en 1 ml van een 1:25 verdunning van een FDA stockoplossing (2 mg/ml in aceton) in PBS toegevoegd. Na 1 uur incubatie bij 37°C in een microtiterplaatschudder in het donker wordt de fluorescentie van de kuipjes gemeten met de Victor² microtiterplaatlezer bij een excitatie- en emissiegolflengte van respectievelijk 486 ±14 en 535 ±25 nm.

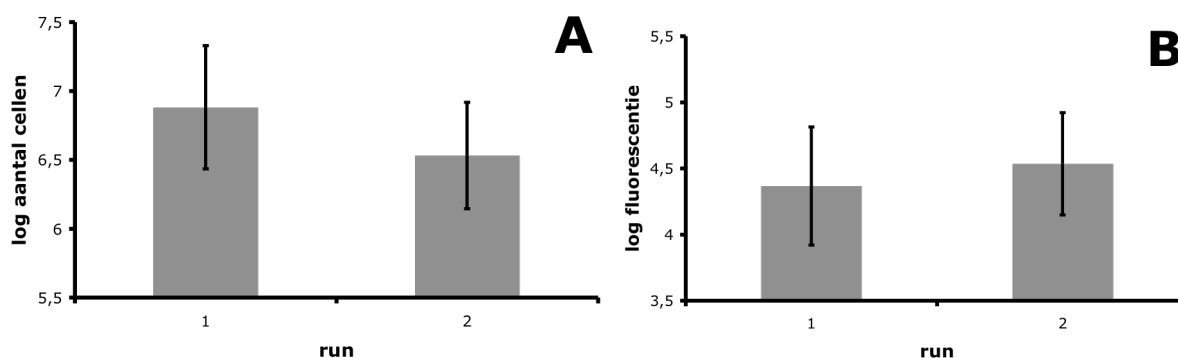
4.2.2.6. Statistische analyse

De resultaten van beide kwantificatie assays voor de drie systemen worden met behulp van SPSS 11.0 software en een UNIANOVA statistiek geanalyseerd. Vooreerst wordt er per systeem en per kwantificatie-techniek een UNIANOVA (6 in totaal) uitgevoerd. Hierbij zijn voor het statisch systeem “schijfje” en “run” “random” factoren. Voor de MRDs is de factor “schijfje” (plaats in de MRD) “fixed” en de factoren “MRD” (MRD-nummer) en “run” “random”. Bij de CDC reactor is de factor “schijfje” (plaats in de staaf) eveneens “fixed”, terwijl de andere factoren “staaf” en “run” “random” zijn. Alle factoren worden samen met hun respectievelijke interactietermen in de modellen gebracht, waarna de niet-significante ($P > 0.05$) interacties stapsgewijs uit het model worden verwijderd. Voor significante “fixed” factoren wordt een Scheffé post-hoc test uitgevoerd. De respectievelijke GMs van ieder assay worden vervolgens via dezelfde statistiek vergeleken. LSD post-hoc testen (Armstrong et al., 2000) worden uitgevoerd wanneer een significante invloed van de factor “systeem” (statisch, MRD of CDC) wordt teruggevonden. Op het einde van de analyses wordt uit de respectievelijke GM en RMSE de VC berekend.

4.2.3. Resultaten

4.2.3.1. Het statisch systeem

In Fig. 4.11.A en B worden respectievelijk het log aantal cellen en de log fluorescentie in functie van de run weergegeven. Uit beide UNIANOVA analyses blijkt de interactieterm tussen “schijfje” en “run” niet significant ($P > 0.05$), zodat die uit het model wordt gelaten. Beide factoren vertonen in het finale model geen significante ($P > 0.05$) invloed op respectievelijk het log aantal cellen en de log fluorescentie. In het statisch systeem worden een GM \pm RMSE voor de uitplating en het FDA assay van respectievelijk 6.6 ± 0.1 en 4.2 ± 0.1 bekomen. De variatiecoëfficiënten bedragen respectievelijk 2.0 en 3.0%.



Figuur 4.11. Log aantal cellen (A) en log fluorescentie (B) van statisch gegroeide biofilms in functie van de run (n= 6)

4.2.3.2. De MRDs

In Tabel 4.1. worden respectievelijk het log aantal cellen en de log fluorescentie per MRD en schijfje in functie van de run weergegeven. Uit de UNIANOVA, met het log aantal cellen als respons uitgevoerd, blijkt geen enkele interactieterm significant. Zij worden dan ook allemaal uit het model genomen. Enkel de factor “run” heeft in het finale model een significante ($P < 0.05$) invloed op de respons.

Tabel 4.1. Log aantal cellen en log fluorescentie in functie van MRD- en schijfjesnummer voor 2 runs

MRDnr	schijfjesnr	respons			
		log aantal cellen		log fluorescentie	
		run1	run2	run1	run2
MRD1	1	6.4	7.2	5.1	5.3
	2	6.3	6.7	5.1	4.9
	3	6.0	6.5	4.5	5.0
MRD2	1	6.4	5.9	4.8	5.1
	2	6.3	7.0	4.9	5.0
	3	6.0	6.8	-	4.7
MRD3	1	6.1	6.3	5.2	5.0
	2	6.4	6.4	4.2	4.1
	3	6.3	6.5	4.3	4.6

In de UNIANOVA, uitgevoerd met log fluorescentie als respons, worden alle interactietermen wegens niet-significantie uit het model genomen. Enkel de invloed van de factor “schijfje” is significant ($P < 0.05$). Voor de factor “MRD” wordt een trend opgemerkt ($0.05 < P < 0.1$). De factor “run” is niet significant. Uit de post-hoc test (Scheffé) voor de factor “schijfje” blijkt dat de respons van de schijfjes dichtst bij de pomp het hoogst is en afneemt naar het uiteinde van de MRD toe. Voor het log aantal cellen en de log fluorescentie worden een GM \pm RMSE van respectievelijk 6.4 ± 0.8 en 4.8 ± 0.1 bekomen. De variatiecoëfficiënten bedragen respectievelijk 11.8 en 1.4%.

4.2.3.3. De CDC reactor

Tabel 4.2. illustreert het log aantal cellen en de log fluorescentie bekomen voor de biofilms gegroeid in de CDC reactor op de verschillende staven en de positie binnen deze staven (boven, midden en onder) in functie van de run. Geen enkele van de interactietermen blijken in de UNIANOVA-analyse, uitgevoerd met log aantal cellen als respons, significant. Het finale statistische model toont aan dat geen enkele factor een significante ($P > 0.05$) invloed op de respons heeft. De GM \pm RMSE bedraagt 8.5 ± 0.1 en de VC 0.5%.

Tabel 4.2. Log aantal cellen en log fluorescentie in functie van het staafnummer en de positie binnen die staaf (B= boven, M= midden, O= onder) voor 2 runs

staafnr	positie	respons			
		log aantal cellen		log fluorescentie	
		run1	run2	run1	run2
staaf1	B	8.5	8.3	5.8	5.7
	M	8.6	8.3	5.7	5.8
	O	8.4	8.3	5.7	5.8
staaf2	B	8.3	8.7	5.7	5.7
	M	8.3	8.2	5.7	5.7
	O	8.5	8.3	5.7	5.7
staaf3	B	8.8	8.5	5.7	5.7
	M	8.4	8.6	5.7	5.7
	O	8.4	8.8	5.7	5.7

Ook bij de UNIANOVA met log fluorescentie als respons worden geen significante interactietermen teruggevonden. De finale analyse wijst uit dat enkel de factor “run” een significante invloed ($P < 0.05$) heeft op de respons. Hier worden een GM \pm RMSE en VC van respectievelijk 5.8 ± 0.01 en 0.1% bekomen.

4.2.3.4. Vergelijking van de drie biofilmsystemen

De statistische vergelijking tussen het log aantal cellen bekomen in de 3 systemen toont aan dat de CDC reactor significant ($P < 0.01$) meer cellen oplevert dan zowel het statisch systeem als de MRDs. Het statisch systeem op zijn beurt levert dan weer significant ($P < 0.01$) meer cellen op dan de MRDs. Bij dezelfde analyse met log fluorescentie als respons geeft opnieuw de CDC reactor een significant ($P < 0.01$) hogere fluorescentie dan de andere twee systemen. De fluorescentierespons voor de MRDs ligt, in tegenstelling tot het log aantal cellen, significant ($P < 0.01$) hoger dan voor het statisch systeem.

4.2.4. Bespreking

In dit werk worden drie biofilmsystemen, respectievelijk een statisch systeem, de MRDs en de CDC biofilmreactor, met elkaar vergeleken. Het statisch systeem vertoont een goede herhaalbaarheid, d.w.z. geen statistisch significante invloeden van de factoren “schijfje” en “run”, voor beide responsvariabelen, n.l. log aantal cellen en log fluorescentie. Daarenboven worden met dit systeem lage VC bekomen voor beide responsen. Het gemiddeld log aantal cellen is echter aan de lage kant (6.6). Dit is in overeenstemming met wat Ghigo (2003) opmerkt over statische systemen. Deze zouden voornamelijk een adhesie van cellen toelaten, maar, door de afwezigheid van een vloeistofstroom, geen echte biofilmvorming.

De MRDs vertonen voor het log aantal cellen geen goede herhaalbaarheid tussen experimenten (de factor “run” was significant). Deze runs waren echter de eerste uitgevoerd met de geminiaturiseerde toestellen en kunnen als preliminair worden beschouwd. Dit wordt bevestigd door de hoge VC die wordt teruggevonden (12%) in vergelijking met die van het statisch systeem (2%) en de CDC reactor (1%). De herhaalbaarheid voor de fluorescentierespons was beduidend slechter, met twee significante factoren (“run” en “schijfje”), waarbij duidelijk is dat er een hogere fluorescentie gemeten wordt voor de schijfjes die dichter naar de pomp toe zitten (cfr. post-hoc testen voor “schijfje”). De lage VC voor het FDA-assay is wel opmerkelijk, wat kan hebben bijgedragen tot de snelle detectie van een significante invloed van de factoren “run” en “schijfje”.

De herhaalbaarheid van de uitplating voor de schijfjes, afkomstig uit de CDC reactor, is uitstekend, met een lage VC en een hoog gemiddeld log aantal cellen (8.5). Ook bij dit systeem wordt sneller een significante invloed van een factor (“run”) opgemerkt bij het FDA assay dan bij de uitplating. De zeer lage VC (0.1%), in vergelijking met alle andere VCn, kan aan de basis hiervan liggen.

Qua rendement (gemiddeld log aantal cellen en log fluorescentie) levert de CDC reactor biofilms met de hoogste celdensiteit op. Tussen beide responsen blijkt een discrepantie te zijn voor de MRDs en het statisch systeem, waarbij de fluorescentierespons van de biofilms gegroeid in de MRDs hoger is dan die in het statisch systeem, terwijl de relatie tussen het log aantal cellen voor beide systemen omgekeerd is.

4.2.5. Besluit

Met de CDC reactor kunnen op een herhaalbare manier biofilms met hoge densiteit worden gegenereerd. Ook het statisch systeem vertoont een goede herhaalbaarheid, hoewel hier twijfel bestaat over de kwaliteit van de gegroeide “biofilm”. De MRD is een handig biofilmsysteem, maar verder onderzoek is noodzakelijk om de slechte herhaalbaarheid van het systeem te verbeteren. Het voordeel van dit systeem is dat er verschillende MRDs in parallel kunnen worden opgesteld om op deze manier biofilmvorming onder verschillende omstandigheden, zoals bvb. op al dan niet gemodificeerde schijfjes, te volgen. De CDC reactor daarentegen is meer geschikt voor de studie van biofilmgroei in functie van de tijd.

4.3. KWANTIFICATIE VAN GISTBIOFILMS

4.3.1. Principe

Voor de vergelijking van de kwantificatiemethoden worden de *C. albicans* biofilms op siliconenschijfjes in de CDC biofilmreactor gekweekt. Via sonicatie en krachtig vortex-mixen worden de cellen van de schijfjes losgemaakt en na seriële verdunning via de plaatgietmethode uitgeplaat. Voor de “surrogaat”-assays (het XTT-, FDA- en SYTO[®] 9-assay) worden de schijfjes in de kuipjes van een microtiterplaat gelegd, waaraan het gepaste medium en enzymsubstraat of fluorochoorm wordt toegevoegd. Na de bijhorende incubatie in een microtiterplaatschudder wordt de fluorescentie of absorptie van ieder kuipje gemeten met een microtiterplaatlezer.

Het doel van deze experimenten is om na te gaan of de 4 kwantificatiemethoden verschillen in biofilmbiomassa kunnen detecteren. Daartoe wordt op statistische basis nagegaan of een tijdsafhankelijke toename in biomassa al dan niet tot een significante stijging van de respons aanleiding geeft.

4.3.2. Materialen en methoden

4.3.2.1. Biofilmsysteem

De opstelling en de procedure voor de kweek van *C. albicans* biofilms op siliconenschijfjes in de CDC reactor worden beschreven in 4.2. De procedure is hier licht gewijzigd. De reactor wordt na de eerste 24 uur groeifase naar de LAF-kast gebracht, waarna 12 met biofilms overgroeide schijfjes (3 voor iedere kwantificatie-techniek) uit de staven worden gehaald en door nieuwe steriele schijfjes worden vervangen. Een nieuwe fles met groeimeidium wordt met de reactor verbonden, die op zijn beurt terug in de opstelling wordt geplaatst. Na de tweede 24 uur groeifase worden de 12 schijfjes (3 voor iedere kwantificatietechniek), die nu 48 uur groeifase hebben doorlopen, uit de staven gehaald. Het experiment wordt uitgevoerd met drie *C. albicans* (CA25, CA35 en CA36) stammen.

4.3.2.2. Kwantificatietechnieken

Twee groepen van 12 schijfjes (3 per kwantificatietechniek) worden bemonsterd op twee tijdstippen tijdens de biofilmontwikkeling. Vervolgens wordt de biomassa van de overgroeide schijfjes bepaald met behulp van de 4 kwantificatietechnieken (uitplating en de SYTO[®] 9-, FDA- en XTT-assays). Hierbij worden per techniek drie schijfjes, na

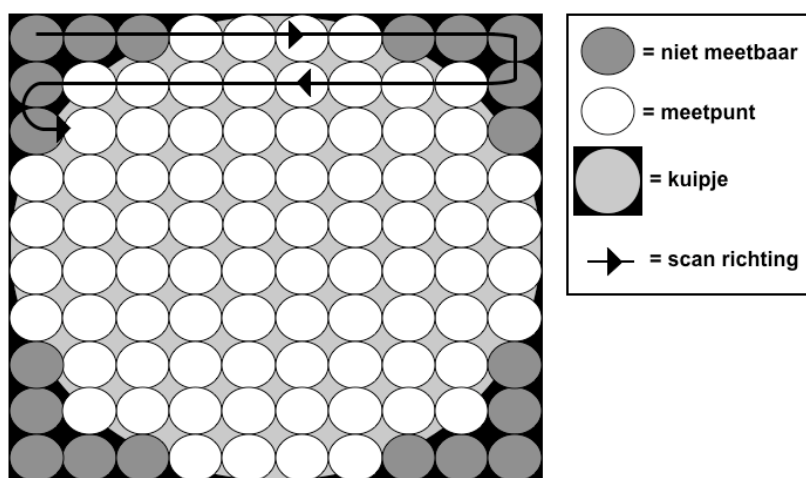
verwijdering uit de reactor, en één steriel schijfje, als controle, geëvalueerd. Voor de procedures van uitplating en het FDA-assay wordt verwezen naar 4.2.2.5.

4.3.2.2.1. Het XTT-assay

De schijfjes voor het XTT-assay worden in een doorzichtige microtiterplaat met 24 kuipjes gelegd. Vervolgens worden aan ieder kuipje 2.5 ml PBS en 54 μ l van een mengsel van 50 μ l XTT oplossing (1 mg/ml voorverwarmde PBS) en 4 μ l menadione (17.22 mg/100 ml aceton) toegevoegd. Na 5 uur incubatie bij 37°C wordt 1 ml van ieder kuipje overgebracht in een eppendorfbuisje. Deze buisjes worden vervolgens gecentrifugeerd (4 min, 12000 rpm) om de aanwezige cellen te verwijderen. Van het supernatans wordt 200 μ l in de kuipjes van een weefselcultuurplaat met 96 kuipjes gepipetteerd. De absorptie van de kuipjes wordt gemeten met behulp van de Victor² microtiterplaatlezer bij een golflengte van 486 ± 10 nm.

4.3.2.2.2. Het SYTO[®] 9-assay

Voor het SYTO[®] 9-assay worden de 4 schijfjes overgebracht in een zwarte microtiter-plaat met 24 kuipjes. Aan elk kuipje worden vervolgens 1 ml FW en 100 μ l van een 1:50 verdunning van een SYTO[®] 9 oplossing in FW toegevoegd. De plaat wordt 15 min geïncubeerd bij 37°C in een microtiterplaatschudder in het donker. De fluorescentie wordt met behulp van de microtiterplaatlezer in scanning modus (Fig. 4.12.) bij een excitatie- en emissiegolflengte van respectievelijk 486 ± 10 en 535 ± 25 nm gemeten. Hierbij wordt de fluorescentie van 80 punten in het kuipje bepaald, waarvan echter alleen de 60 punten, die binnen het oppervlak van het schijfje vallen, worden geselecteerd om een gemiddelde fluorescentierespons te berekenen.



Figuur 4.12. Schematische voorstelling van het scannen van een kuipje voor de kwantificatie van een met SYTO[®] 9 fluorescent "gekleurde" biofilm op een siliconenschijfje

4.3.2.3. Statistische analyse

Op de resultaten van de 4 assays worden de invloeden van “tijd” (bemonstering na 24 en 48 uur) en “stam” (CA25, CA35, CA36) op de respons met behulp van lineaire regressie, een UNIANOVA statistiek en SPSS 11.0 software bepaald. De categorische predictoren “tijd” en “stam” worden in het statistisch model geïntroduceerd als “fixed” factoren. Het GLM wordt eerst gefit met de hoofdeffecten van de twee predictoren en de tweewegs-interactieterm (“tijd” x “stam”). Indien de interactieterm niet significant is ($P > 0.05$) wordt hij verwijderd, waarna het model opnieuw op de data wordt toegepast. De statistische analyse wordt met de resultaten van ieder assay afzonderlijk uitgevoerd.

4.3.3. Resultaten

De responswaarden bekomen met de 4 assays op twee tijdstippen voor de 3 *C. albicans* stammen zijn voorgesteld in Tabel 4.3. De resultaten zijn uitgedrukt als, respectievelijk, absorptie-eenheden $\times 10^3$ (het XTT-assay), het logaritme van fluorescentie-eenheden (de FDA- en SYTO[®] 9-assays) en log aantal cellen per schijfje (uitplating).

Tabel 4.3. De responswaarden bekomen met de 4 assays voor de kwantificatie van *C. albicans* biomassa op twee tijdstippen in functie van de *C. albicans*-stam

stam	respons (SD) op twee tijdstippen voor de 4 assays							
	XTT-assay		FDA-assay		SYTO [®] 9-assay		uitplating	
	24 u	48 u	24 u	48 u	24 u	48 u	24 u	48 u
CA25	8.6	70.0	4.9	5.5	4.5	4.5	6.7	7.9
	(5.5)	(0.7)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.2)	(0.2)	(0.1)
CA35	8.3	12.3	3.6	4.1	3.9	4.1	5.7	6.7
	(3.3)	(7.5)	(0.1)	(0.2)	(0.1)	(0.2)	(0.3)	(0.1)
CA36	26.0	125.7	4.5	5.1	4.7	4.6	6.6	7.4
	(14.3)	(10.4)	(0.1)	(0.2)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.1)

De responswaarden zijn gemiddelden voor 3 schijfjes (SD). De resultaten van het XTT-assay zijn uitgedrukt als absorptie-eenheden $\times 10^3$, die van het FDA- en SYTO[®] 9-assay als het logaritme van fluorescentie-eenheden en de resultaten van de uitplating als log aantal cellen per schijfje.

De lineaire regressie van de resultaten van de uitplating op “tijd” en “stam” levert geen significante interactieterm tussen beide predictoren op, zodat deze interactieterm bijgevolg uit het model wordt gelaten. Het gemiddeld log aantal cellen per schijfje na 48 uur groeifase is significant hoger ($P < 0.05$) dan dat bekomen na 24 uur. De biomassa verschilt ook significant tussen de stammen ($P < 0.05$). Wanneer dezelfde analyse wordt uitgevoerd voor het XTT-assay, blijkt de interactieterm wel significant. Dit suggereert dat een toename in biomassa in functie van de tijd stam-afhankelijk is en dat vergelijkingen tussen enerzijds stammen en anderzijds tijdstippen moeilijk uit te voeren zijn. De UNIANOVA statistiek voor het FDA-assay levert geen significante interactieterm op, maar zoals bij de uitplating hebben beide predictoren (“tijd” en “stam”) een significante ($P < 0.05$) invloed op de respons. Voor het SYTO[®] 9-assay wordt ook geen significante interactieterm teruggevonden. Hier heeft echter enkel de factor “stam” een significante ($P < 0.05$) invloed op de responswaarden. Voor de drie stammen kan geen significant verschil tussen de responswaarden, bekomen na 24 en 48 uur biofilmgroei, worden opgemerkt.

4.3.4. Bespreking

De gebruikte “surrogaat”-assays steunen op verschillende werkingsmechanismen. De XTT- en FDA-assays bepalen leefbare cellen, het SYTO[®] 9-assay schat het totaal aantal cellen (levende en dode) en uitplating is een maat voor het aantal kweekbare cellen. Hierbij is het belangrijk op te merken dat de biofilmcellen in de verschillende procedures niet altijd op dezelfde manier worden behandeld. Bij uitplating worden de biofilms onderworpen aan herhaaldelijk soniceren en vortex-mixen, wat een invloed zou kunnen hebben op hun fysiologische toestand. Over het algemeen wordt echter aangenomen dat lage energie sonicatie geen schadelijk effect heeft op gisten (Tsukamoto et al., 2004). Daarenboven zouden de micro-organismen eventuele cellulaire stress kunnen te boven komen in de loop van de 24 uur incubatie bij uitplating.

Aangezien bij uitplating van biofilmcellen een toename in biomassa in functie van de tijd wordt geobserveerd, is het belangrijk na te gaan of de “surrogaat”-assays deze stijging ook kunnen waarnemen. Het XTT-assay was niet in staat om een tijdsafhankelijke toename in biomassa, onafhankelijk van de stam, te meten. De afwezigheid van een significante stijging in respons voor één van de stammen was niet verwacht aangezien deze stam in 4.1 (planktonische cellen) wel een stijging in XTT-respons gaf bij

vergelijkbare celdensiteiten. Een stamafhankelijke verandering in metabole toestand (bvb. minder respiratie) in de biofilmcellen zou een verklaring kunnen zijn voor dit ongewoon resultaat. Kuhn et al. (2002) suggereren dat cellen van sterk biofilmvormende *Candida* stammen hun metabolisme kunnen verschuiven, zodat metabole activiteiten, zoals respiratie, zouden verminderen, wat kan leiden tot een verlaagde respons in het XTT-assay.

In tegenstelling tot deze bevindingen voor het XTT-assay, wordt met het FDA-assay wel een stamonafhankelijke toename in respons gezien in functie van de tijd (en dus van celdensiteiten). Er wordt ook een significant verschil in respons tussen stammen gevonden, wat in overeenstemming is met de resultaten voor de planktonische cellen (zie 4.1). Deze resultaten suggereren geen stamafhankelijke verschillen in veranderingen in esterase-activiteit, opname van het substraat en efflux van het splitsingsproduct tussen biofilmcellen en planktonische cellen. De esterases die verantwoordelijk zijn voor de splitsing van het FDA vormen een verzameling van enzymen (Degrassi et al., 1999; Schermers et al., 1976) en deze activiteit is wellicht meer robuust tegen veranderingen in fenotype.

Met behulp van het SYTO[®] 9-assay wordt alleen een verschil tussen de verschillende stammen aangetoond, maar geen tijdsafhankelijk verschil in biomassa. Hier zou een accumulatie van dode cellen in de eerste fase van de biofilmgroei (24 uur) de afwezigheid van een toename in respons tussen de twee tijdstippen kunnen verklaren.

4.3.5. Besluit

Van de geteste kwantificatietechnieken zijn alleen uitplating en het FDA-assay in staat om een tijdsafhankelijke toename in biofilmbiomassa te detecteren. Het FDA-assay is minder arbeidsintensief dan het XTT-assay en makkelijk toepasbaar op niet-doorzichtige oppervlakken, aangezien fluorescentie niet wordt gemeten in transmissiemodus. Bij het tot nog toe quasi-algemeen gebruik van het XTT-assay in andere onderzoeken met betrekking tot *C. albicans* biofilms kunnen terecht vraagtekens worden geplaatst.

5. PREVENTIE VAN GISTBIOFILMVORMING: ANTIMYCOTISCHE SILICONEN

5.1. PRINCIPES

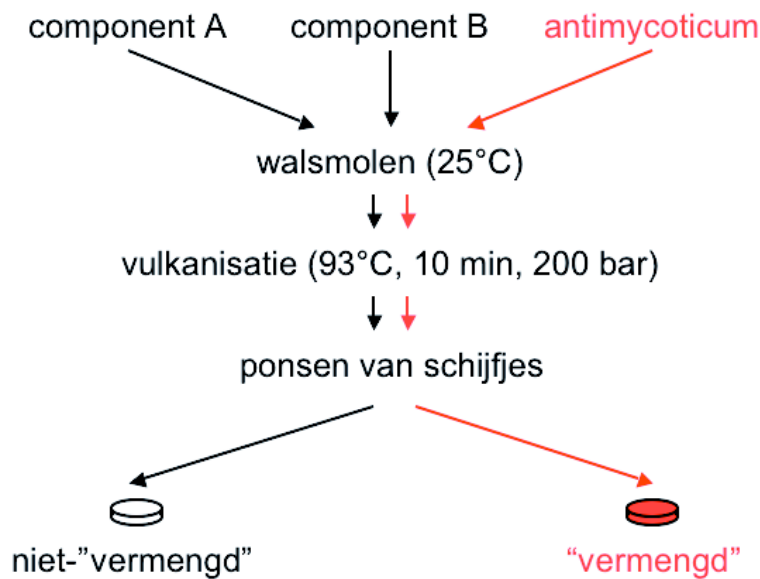
In dit werk wordt de toepasbaarheid van de oplading van een antimycoticum in polysiloxaan voor de preventie van *C. albicans* biofilmvorming onderzocht. Hiertoe wordt polysiloxaan opgeladen door rechtstreeks mengen van AM met ongevulkaniseerd polysiloxaan vóór polymerisatie (= een “admixture” of “vermengd” polymeer). Daarnaast wordt polysiloxaan antimycotisch gemaakt door het op te laden met AM met behulp van een organisch solvent (= geïmpregneerd polysiloxaan). De vrijstelling van AM uit deze beide types potentieel antimycotisch siliconenmateriaal wordt nagegaan met behulp van HPLC en een diskdiffusietest. Het effect van het “vermengd” polysiloxaan op de biofilmvorming door *C. albicans* wordt geëvalueerd aan de hand van de systemen voor kweek en kwantificatie van biofilms, beschreven in 4.

5.2. MATERIALEN EN METHODEN

5.2.1. Bereiding van de antimycotische siliconen

5.2.1.1. “Vermengd” polysiloxaan

In de biofilmexperimenten wordt gebruik gemaakt van “vermengde” en niet-“vermengde” siliconenschijfjes. Voor de bereiding van de niet-“vermengde” siliconenschijfjes wordt verwezen naar 4.2.2.3. Voor de vervaardiging van de “vermengde” siliconenschijfjes wordt hetzelfde proces als voor de niet-“vermengde” gebruikt, met dit verschil dat er een antimycoticum aan het polysiloxaan wordt toegevoegd (Fig. 5.1) (Malcolm et al., 2004). Het nystatine poeder wordt in verschillende concentraties (0.5, 1 en 2% w/w) homogeen gemengd met gelijke delen A en B van de siliconenkit. Dit “vermengd” mengsel wordt aan dezelfde vulkanisatievoorwaarden onderworpen als het niet-“vermengd” polysiloxaan. Miconazol wordt in slechts 1 concentratie (2% w/w) met het polymeer gemengd.



Figuur 5.1. Schematische voorstelling van de vervaardiging van “vermengde” en niet-“vermengde” siliconenschijfjes

Het elasticiteitsprofiel (S') tijdens de vulkanisatie van de “vermengde” en niet-“vermengde” schijfjes wordt bepaald met behulp van een reometer (MDR 2000E, Monsanto, Akron, OH, USA). Uit de bekomen vellen met nystatine “vermengd” polysiloxaan worden schijfjes geponst, maar in tegenstelling tot de niet-“vermengde” schijfjes worden deze niet gewassen of geautoclaveerd om uitloging of destructie van het geïncorporeerd nystatine te voorkómen. Wel worden ze na vulkanisatie aseptisch behandeld om eventuele contaminatie te vermijden. De diameters van de schijfjes zijn 10, 8 en 13 mm voor gebruik in, respectievelijk, het statisch systeem, de MRDs en de CDC biofilmreactor.

5.2.1.2. Geïmpregneerd polysiloxaan

Er worden ook schijfjes geïmpregneerd met nystatine via solventoplading (Kohnen et al., 2003) in het Laboratorium voor Polymeermaterialen (Universiteit Gent, Prof. Dr. E. Schacht). Hierbij worden niet-“vermengde” schijfjes in een oplossing van nystatine in methanol (2.5, 5 en 10 mg/ml) gesuspenderd. Het organisch solvent zorgt voor een kleine zwelling van de siliconenmatrix van het schijfje en laat toe dat het antimycoticum in het polysiloxaan kan diffunderen. Na 24 uur weken worden de schijfjes uit de nystatine-oplossing gehaald en worden de restanten van het solvent afgedampt onder vacuüm. Het in het schijfje gediffundeerd antimycoticum zit dan “gevangen” in de siliconenmatrix.

5.2.2. Vrijstelling van het nystatine

De vrijstelling van het nystatine in waterig milieu wordt met behulp van een HPLC-methode nagegaan (Groll et al., 1999, 2000; Wilson et al., 2001). Het HPLC systeem bestaat uit een Kontron 420 HPLC-pomp (Kontron instruments, Zürich, Zwitserland), een Kontron 430 HPLC UV detector met Kromasystem 2000 software en een Hypersil C18 BDS RP kolom (25 cm x 4.6 mm, 5 µm deeltjesgrootte, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Detectie gebeurt bij 305 nm met een responstijd van 0.1 s en een attenuatie van 0.05. De mobiele fase bestaat uit 10 mM natriumfosfaat, 1 mM Na₂EDTA, 30% HPLC-grade methanol (Sigma) en 30% HPLC-grade acetonitrile (Sigma), op pH 6.0 gebracht met 85% fosforzuur (Sigma). De mobiele fase wordt gefiltreerd door een 0.45 µm HVLP filter (Millipore, Bedford, MA, USA) en ontgast met behulp van Helium. Het injectievolume bedraagt 20 µl en elutie wordt isocratisch uitgevoerd bij kamertemperatuur aan een debiet van 1 ml/min.

Voor de bepaling van de vrijstelling van nystatine uit de opgeladen schijfjes worden deze laatste eerst in vloeibare stikstof ondergedompeld, waarna ze met een mixer (Yellowline A10) worden gemalen. Het bekomen poeder wordt vervolgens gewogen, in 10 ml gedistilleerd water gebracht en 24 uur bij kamertemperatuur bewaard. Na deze uitloging wordt een deel van deze suspensie gefiltreerd door een 0.2 µm PVDF-filter (Acrodisc, Pall, East Hills, NY, USA) en van het filtraat wordt er 20 µl geïnjecteerd in het HPLC-systeem. Een standaardcurve wordt opgesteld door aan de loogvloeistof van niet-”vermengde” schijfjes, respectievelijk 300, 400, 700, 800 en 900 µl van een nystatine stockoplossing (5 mg/ml methanol) toe te voegen en aan dezelfde procedure als hierboven te onderwerpen.

Aan de hand van deze standaardcurve wordt de concentratie aan nystatine in de loogvloeistof van een opgeladen schijfje bepaald. Hieruit wordt het totaal gewicht aan nystatine dat vrijkomt uit deze schijfjes berekend waarna, rekening houdend met de massa van de polysiloxaan-nystatine mengsels, tenslotte de concentratie aan vrij nystatine in de schijfjes (% w/w) wordt berekend.

5.2.3. Antimycotisch effect van met nystatine opgeladen polysiloxaan

Met behulp van een diskdiffusietest (Barry en Brown, 1996; Hazen et al., 2003) wordt het antimycotisch effect van de fractie vrij nystatine in de opgeladen siliconenschijfjes aangetoond. Het inoculum wordt bereid uitgaande van een 18-24 uur oude cultuur van *C. albicans* SC5314 op SDA. Er wordt een suspensie gemaakt van de cultuur in FW die turbidimetrisch wordt gestandaardiseerd. Daartoe wordt de OD van de suspensie bij 530 nm aangepast tot die 0.11 à 0.12 bedraagt ($1-5 \times 10^6$ KVE/ml). Dit inoculum wordt met behulp van een steriele swab homogeen uitgestreken op een petriplaat met Mueller-Hinton agar (BD), gesupplementeerd met 2% glucose en 0.5 µg/ml methyleenblauw. Op deze platen worden “vermengde” en niet-“vermengde” schijfjes gelegd, waarna de platen 24 uur bij 37°C worden geïncubeerd. Na deze groeifase worden de inhibitiezones (zones waar geen groei optreedt) gemeten met een schuifpasser.

Voor iedere concentratie aan nystatine (0, 0.5, 1 en 2%) worden drie schijfjes getest. Daarnaast worden 6 schijfjes per concentratie achtereenvolgens tweemaal in 50 ml PBS gelegd, het geheel wordt aan 30 s sonicatie onderworpen en het supernatans wordt gedecanteerd. Hierna worden er 3 schijfjes per concentratie voor de test gebruikt, terwijl de overige schijfjes vóór het testen 3 weken bij kamertemperatuur worden bewaard. Ook het antimycotisch effect van het nystatine, vrijgesteld uit via solventoplading geïmpregneerde schijfjes, wordt aan de hand van deze diffusietest in drievoud bepaald. Controleschijfjes, die in methanol zonder nystatine werden gesuspenderd, worden ook in de analyse meegenomen.

5.2.4. Evaluatie van het antibiofilm effect van “vermengd” polysiloxaan

Het antibiofilmeffect van de “vermengde” siliconenschijfjes wordt met behulp van drie systemen voor in vitro biofilmgroei en twee kwantificatietechnieken geëvalueerd (zie 4.2.). Enkel de aanpassingen aan de procedures worden verderop vermeld.

5.2.4.1. Het statisch biofilmsysteem

In het statisch systeem worden 6 siliconenschijfjes per nystatineconcentratie en, als controle, drie niet-“vermengde” schijfjes getest. De kwantificatie van de biofilmbiomassa gebeurt met behulp van uitplating en het FDA-assay. Per concentratie worden telkens 3 schijfjes geanalyseerd.

5.2.4.2. De MRDs

In de MRDs worden naast de niet-“vermengde” controleschijfjes slechts 2 nystatineconcentraties getest, n.l. 0.5 en 2%. Per MRD worden 6 schijfjes van één nystatineconcentratie gebruikt. De biofilms van 3 schijfjes worden met behulp van uitplating en van de drie andere met het FDA-assay gekwantificeerd.

5.2.4.3. De CDC biofilmreactor

In de CDC reactor worden 6 schijfjes per nystatineconcentratie en 6 niet-“vermengde” schijfjes getest. De schijfjes worden over twee staven per concentratie verdeeld, waarbij de biofilms van de schijfjes van de ene staaf gekwantificeerd worden met behulp van uitplating en die van de andere staaf met behulp van het FDA-assay.

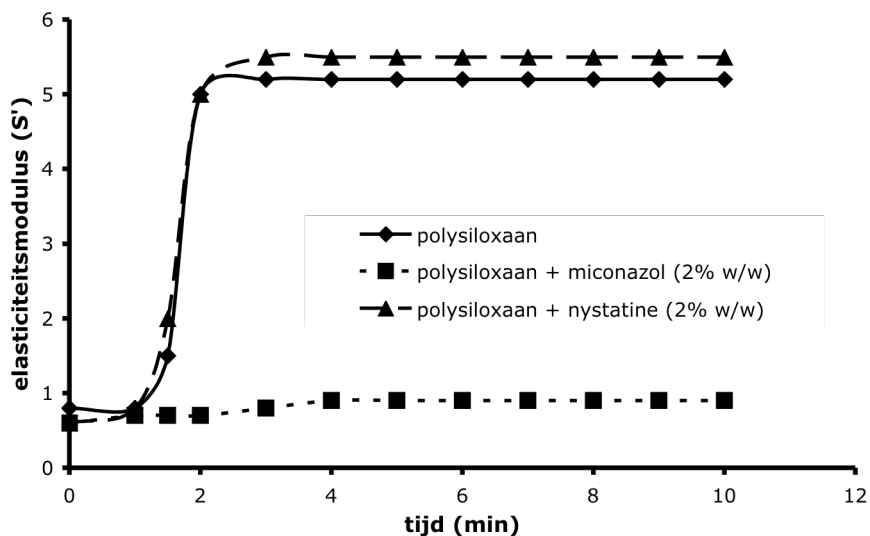
5.2.4.4. Statistische analyse

De resultaten van de biofilmexperimenten worden geëvalueerd met behulp van SPSS 11.0 en een UNIANOVA statistiek. Hierbij wordt een statistisch model opgesteld met als fixed factor “nystatine” (de verschillende concentraties aan nystatine) en als respons respectievelijk het log aantal cellen en de log fluorescentie. Dit model wordt onafhankelijk toegepast op de data van de drie biofilmsystemen (statisch, MRD en CDC). Een post-hoc test (LSD) wordt uitgevoerd als een significante invloed van de bovenvermelde factor wordt gevonden,.

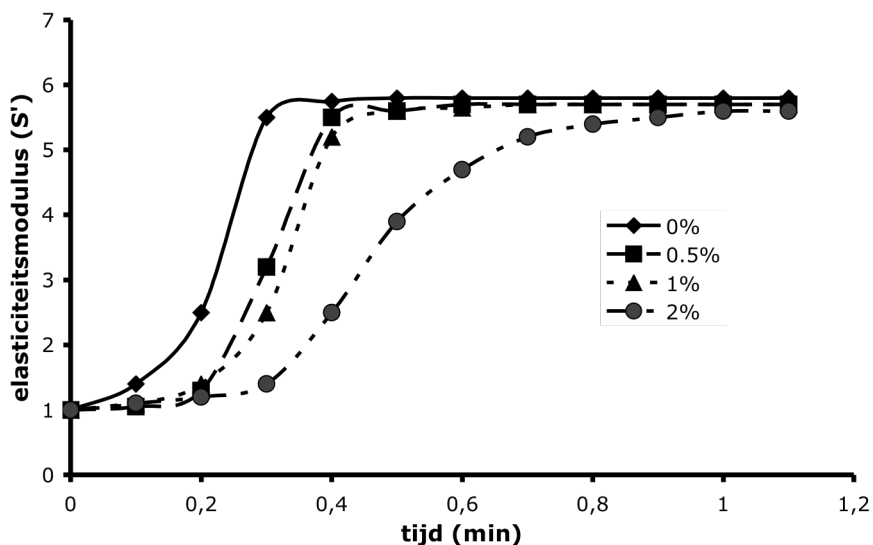
5.3. RESULTATEN

5.3.1. Rheologische gegevens

Uit Fig. 5.2. blijkt dat de elasticiteitsmodulus van het met miconazol “vermengd” polysiloxaan het plateau van het niet-“vermengd” polysiloxaan absoluut niet haalt, die van het met nystatine “vermengd” polysiloxaan daarentegen wel. Dit wordt bevestigd in Fig. 5.3., die illustreert dat het plateau minder snel wordt bereikt naarmate er meer nystatine met het ongevulkaniseerd polysiloxaan wordt gemengd.



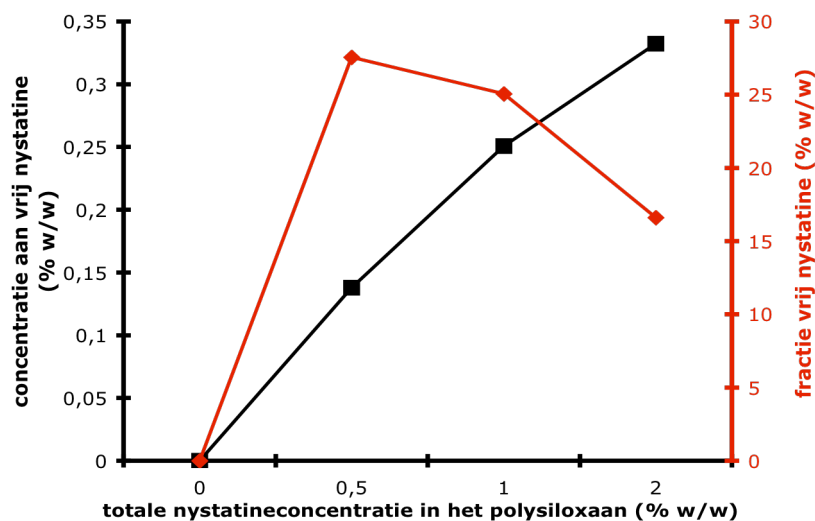
Figuur 5.2. Elasticiteitsmodulus (S') in functie van de tijd tijdens vulkanisatie van “vermengd” (met respectievelijk miconazol en nystatine) en niet-“vermengd” polysiloxaan



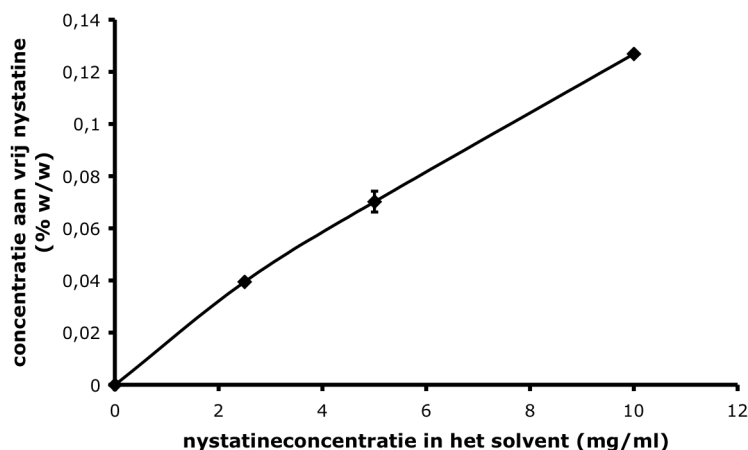
Figuur 5.3. Elasticiteitsmodulus (S') in functie van de tijd tijdens vulkanisatie van “vermengd” (met nystatine in 3 concentraties, n.l. 0.5, 1 en 2%) en niet-“vermengd” polysiloxaan

5.3.2. Vrijstelling van het nystatine

De HPLC-resultaten (Fig. 5.4. en 5.5.) tonen aan dat er uit het “vermengd” en geïmpregneerd polysiloxaan nog nystatine wordt vrijgesteld. Daarenboven stijgt de concentratie aan vrij nystatine proportioneel met de totale hoeveelheid opgeladen nystatine. In het geval van “vermengde” schijfjes is deze concentratie aan vrij nystatine (0.14-0.33%) erg laag in vergelijking met de totale hoeveelheid die wordt opgeladen (0.5-2%). Dit levert een gemiddelde fractie vrij nystatine van ongeveer 20% op, wat dus betekent dat 80% van het nystatine door vulkanisatie “verloren” gaat.



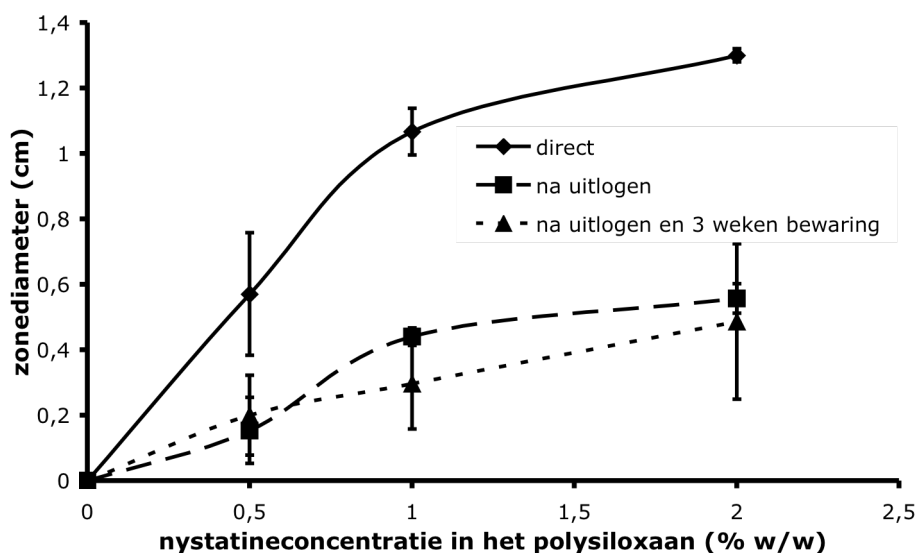
Figuur 5.4. Concentratie aan vrij nystatine (% w/w) \pm SD (zwart) en de vrije fractie aan nystatine (% w/w) \pm SD (rood) in functie van de totale nystatineconcentratie (% w/w) in de “vermengde” siliconenschijfjes (n= 3). De concentraties aan nystatine zijn uitgedrukt als het procent van het gewicht van het opgeladen schijfje (zwart) en als het procent van het gewicht van het nystatine in het polysiloxaan (rood).



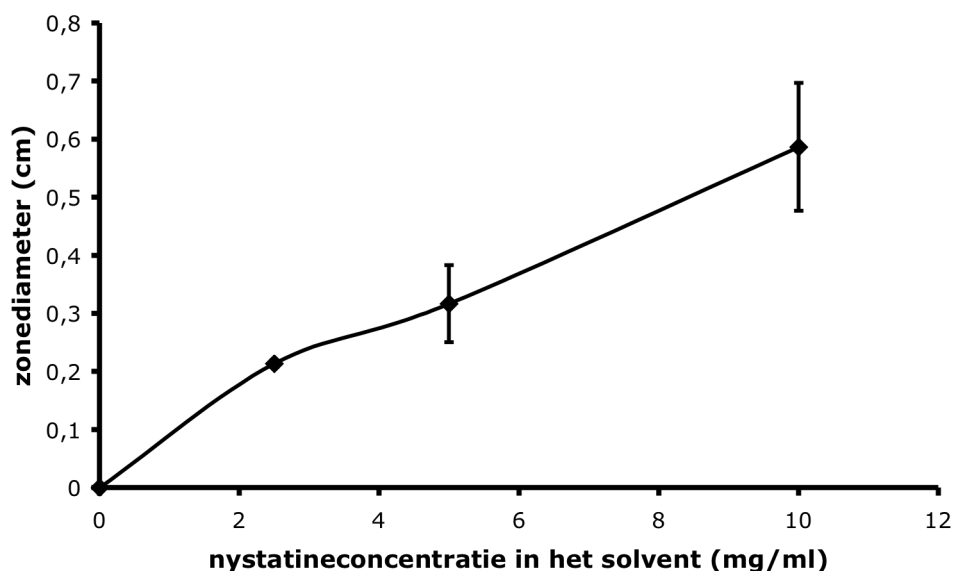
Figuur 5.5. Concentratie aan vrij nystatine (% van het gewicht van het opgeladen schijfje) \pm SD in functie van de nystatineconcentratie (% w/w) in het solvent gebruikt voor impregnatie (n= 3)

5.3.3. Antimycotisch effect van met nystatine opgeladen polysiloxaan

Uit Fig. 5.6. en 5.7. blijkt dat de diameter van de inhibitiezone rond met nystatine opgeladen schijfjes stijgt in functie van de concentratie aan nystatine in het polysiloxaan. Voor de “vermengde” schijfjes daalt deze diameter na uitlogen. Drie weken bewaring van de uitgeloopte schijfjes leidt niet tot een verandering in zonediameter.



Figuur 5.6. Zonediameter \pm SD, bekomen rond de siliconenschijfjes, in functie van de totale nystatineconcentratie van “vermengde” siliconenschijfjes gemeten vóór en na uitlogen en na uitlogen en 3 weken bewaring (n= 3)



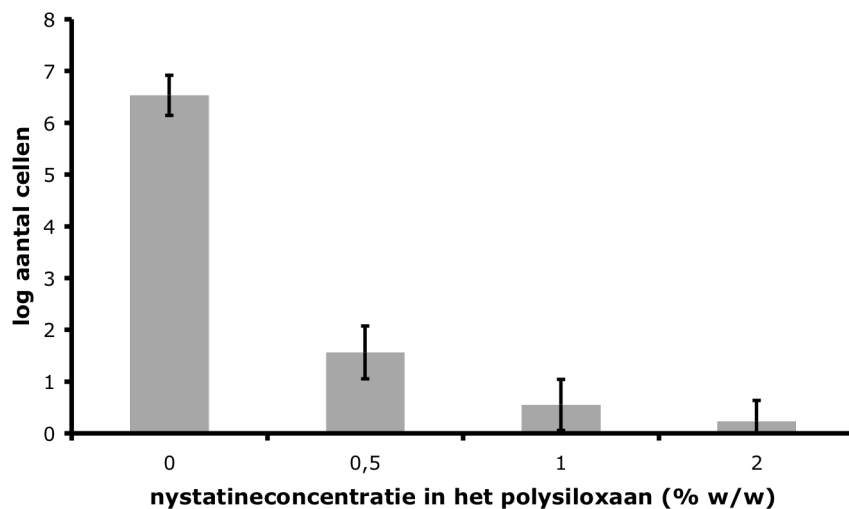
Figuur 5.7. Zonediameter \pm SD, bekomen rond de siliconenschijfjes, in functie van de nystatineconcentratie in het solvent, gebruikt voor impregnatie (n= 3)

5.3.4. Evaluatie van het antibiofilm effect van “vermengd” polysiloxaan

De resultaten van de evaluatie van het antibiofilmeffect worden besproken per kwantificatietechniek (uitplating en het FDA-assay) en per systeem voor biofilmgroei.

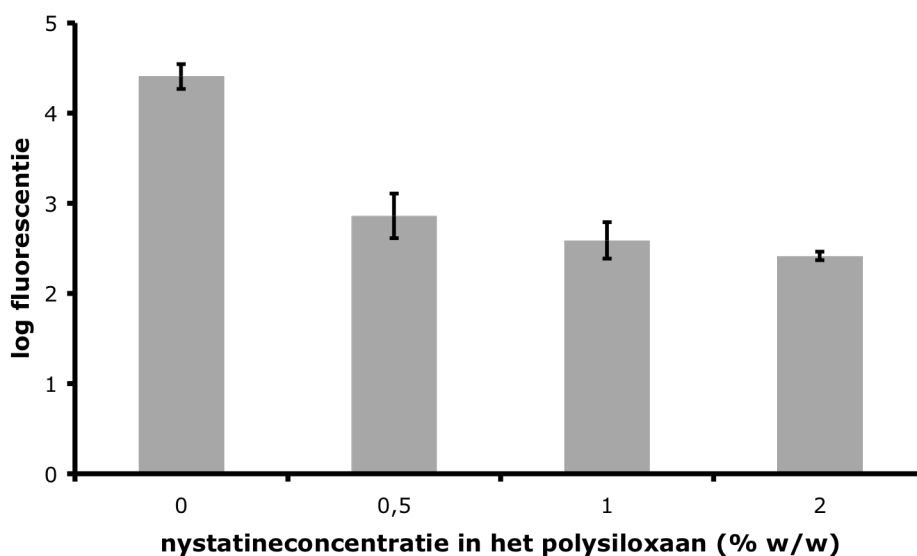
5.3.4.1. Het statisch systeem

In het statisch biofilmsysteem verschilt het log aantal cellen significant tussen de biofilms gegroeid op schijfjes met verschillende nystatineconcentraties ($P < 0.01$). Uit de post-hoc testen (LSD) blijkt dat het log aantal cellen significant verschilt tussen 0 en 0.5/1/2% nystatine ($P < 0.01$) en tussen 0.5 en 1/2% nystatine ($P < 0.05$). Er wordt geen significant verschil gevonden tussen 1 en 2% nystatine. In Fig. 5.8. wordt het log aantal cellen in functie van de nystatineconcentratie van de schijfjes weergegeven.



Figuur 5.8. Log aantal cellen \pm SD in de biofilms, bekomen in het statisch systeem, in functie van de nystatineconcentratie in de siliconenschijfjes ($n = 3$)

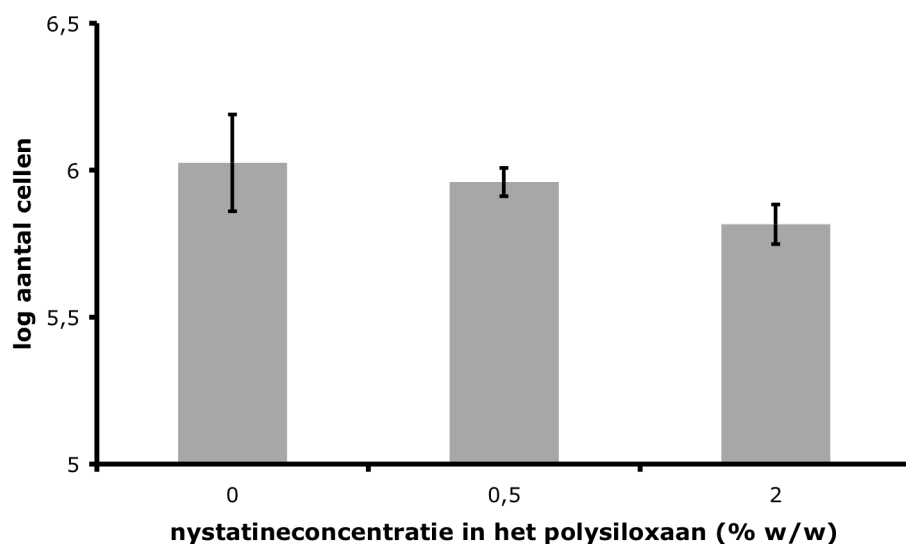
In Fig. 5.9. wordt de log fluorescentierespons uitgezet in functie van de nystatineconcentratie in het polysiloxaan. De UNIANOVA toont aan dat de factor “nystatine” een significante invloed ($P < 0.01$) heeft op de respons. De post-hoc test (LSD) wijst op significante verschillen tussen respectievelijk 0 en 0.5/1/2% nystatine ($P < 0.01$) en 0.5 en 2% nystatine ($P < 0.05$). Tussen 0.5 en 1% wordt een trend opgemerkt ($0.05 < P < 0.1$). De log fluorescentie van biofilms gegroeid op schijfjes met 1% nystatine verschilt niet significant van die van schijfjes met 2% nystatine.



Figuur 5.9. Log fluorescentie \pm SD van de biofilms, bekomen in het statisch systeem, in functie van de nystatineconcentratie in de siliconenschijfjes (n= 3)

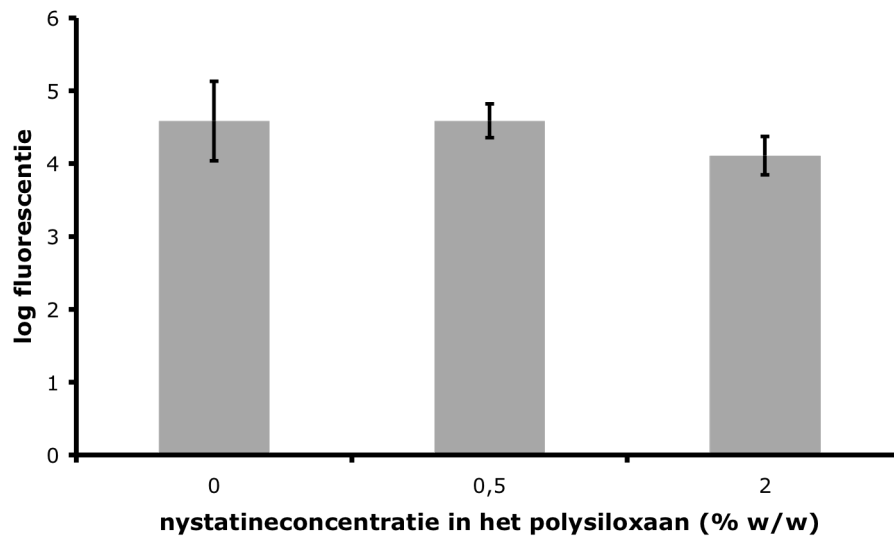
5.3.4.2. De MRDs

In de MRDs wordt geen significante invloed van de nystatineconcentratie op het log aantal cellen in de biofilm vastgesteld. Fig. 5.10. toont het verband tussen het log aantal cellen en de nystatineconcentratie in de siliconenschijfjes.



Figuur 5.10. Log aantal cellen \pm SD in de biofilms, bekomen in de MRDs, in functie van de nystatineconcentratie in de siliconenschijfjes (n= 3)

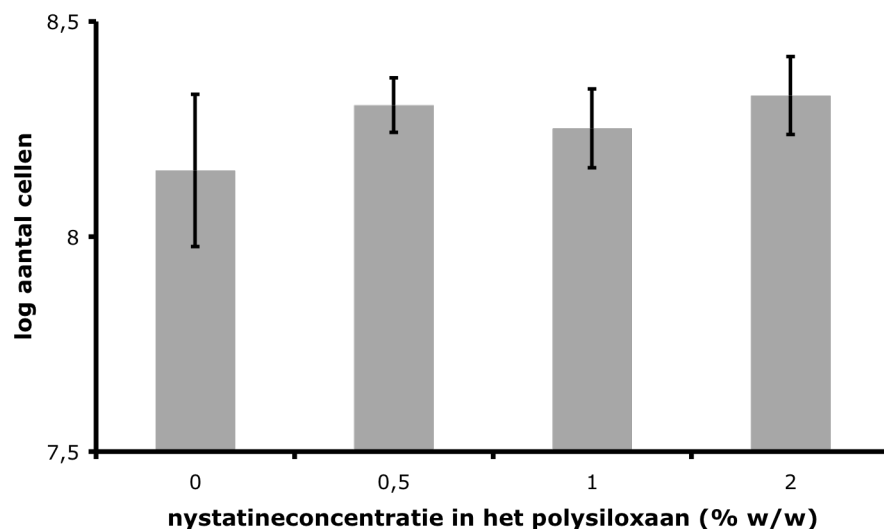
Ook voor de log fluorescentie van de biofilms gekweekt in de MRDs wordt geen significant verschil opgemerkt tussen de verschillende nystatineconcentraties (Fig. 5.11.).



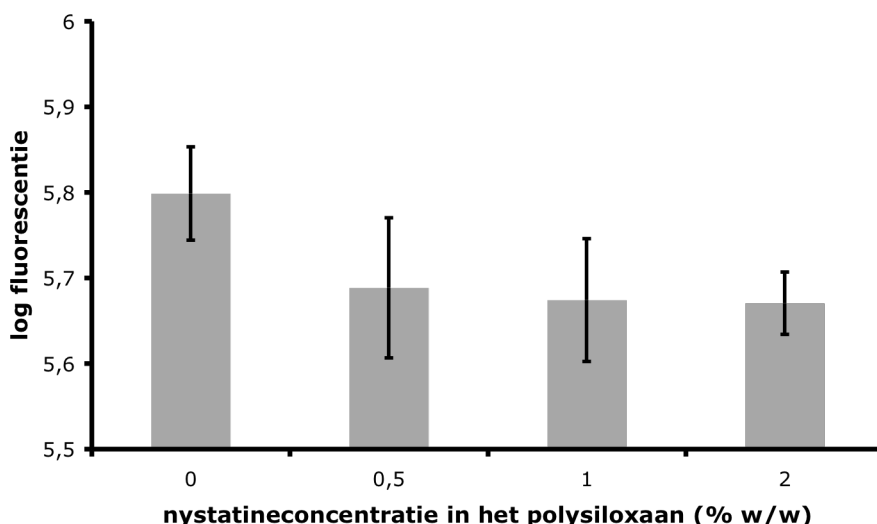
Figuur 5.11. Log fluorescentie \pm SD van de biofilms, bekomen in de MRDs, in functie van de nystatineconcentratie in de siliconenschijfjes (n= 3)

5.3.4.3. De CDC biofilmreactor

In de CDC biofilmreactor worden er tussen het log aantal cellen en de log fluorescentie van de biofilms, gekweekt op schijfjes met verschillende nystatine concentraties, geen significante verschillen gezien (Fig. 5.12. en 5.13.).



Figuur 5.12. Log aantal cellen \pm SD in de biofilms, bekomen in de CDC reactor, in functie van de nystatineconcentratie in de siliconenschijfjes (n= 3)



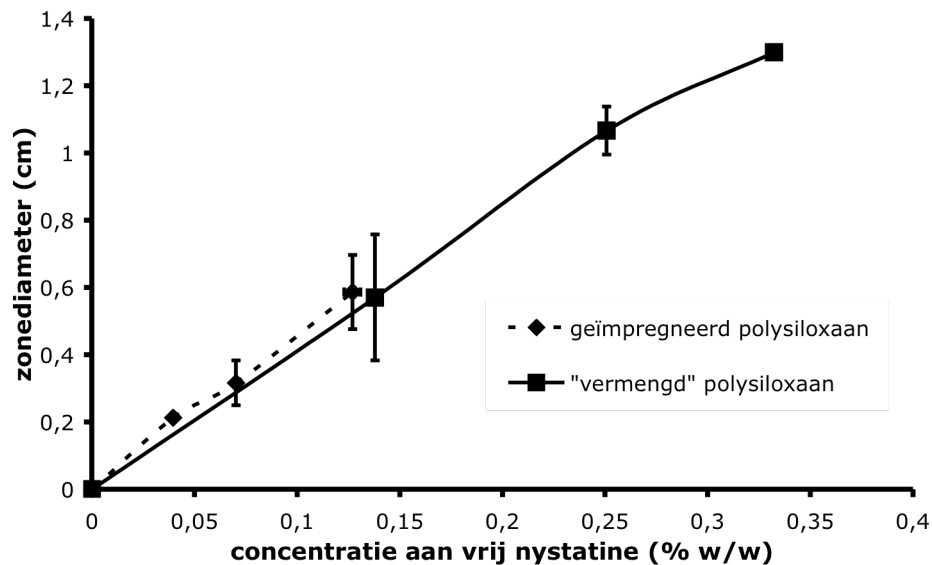
Figuur 5.13. Log fluorescentie \pm SD van de biofilms, bekomen in de CDC reactor, in functie van de nystatineconcentratie in de siliconenschijfjes (n= 3)

5.4. BESPREKING

Enkel het nystatine-polysiloxaan mengsel heeft een aanvaardbaar elasticiteitsprofiel. Miconazol beïnvloedt het polymerisatieproces van het siloxaan negatief. De rheologische gegevens van de verschillende nystatine-polysiloxaan mengsels wijzen daarenboven op een relatie tussen de concentratie aan nystatine en de snelheid van vulkaniseren.

De concentratie aan vrij nystatine stijgt, hoewel niet proportioneel, met de totale nystatineconcentratie in de “vermengde” schijfjes. Een verdubbeling van de nystatineconcentratie (1% – 2%) in het “vermengd” polysiloxaan heeft slechts een minieme stijging (0.25 – 0.33%) in vrij nystatine tot gevolg. Een grote hoeveelheid van het nystatine interageert wellicht met het polysiloxaan tijdens het vulkaniseren (bvb. crosslinking via additie van SiH op de C=C bindingen in nystatine) en zou dus gebonden zijn op het siliconenpolymeer, i.e. niet-vrij nystatine. Al het nystatine in de geïmpregneerde schijfjes daarentegen wordt verondersteld “vrij” (beschikbaar) te zijn. Wanneer de zonediameters bekomen met de “vermengde” en geïmpregneerde schijfjes in functie van de concentratie aan vrij nystatine worden uitgezet (Fig. 5.14.), suggereren het lineair verband en het gelijk verloop van de curven dat het antimycotisch effect van de “vermengde” schijfjes te wijten is aan het vrij nystatine. Oplading van hogere concentraties aan nystatine in polysiloxaan met behulp van solventen is niet mogelijk vanwege de slechte oplosbaarheid van nystatine in ideale siliconenzwellende solventen, bvb.

tetrahydrofuraan. Het antimycoticum lost wel goed op in methanol, wat echter geen goed solvent is voor impregnatie.



Figuur 5.14. Zonediameter \pm SD in functie van de concentratie aan vrij nystatine (% w/w) \pm SD in met nystatine "vermengde" en geïmpregneerde siliconenschijfjes (n= 3)

Dat het "vermengd" polysiloxaan een inhibitiezone oplevert, is in tegenspraak met wat Pigno et al. (1994) rapporteerden over nystatine geïncorporeerd in het polysiloxaan voor een faciale prothese (een "admixture"). Het antimycotisch effect in de diskdiffusietest van het opgeladen polysiloxaan werd hier echter wel op een *Penicillium* isolaat nagegaan, en niet op *C. albicans*, zoals in onze studie. Daarenboven moet worden vermeld dat deze onderzoekers een ander type polysiloxaan hebben gebruikt, wat ook de afwezigheid van het effect zou kunnen verklaren.

De resultaten van de biofilmexperimenten wijzen uit dat de vrijstelling van nystatine een tijdelijke invloed heeft op de biofilmontwikkeling, aangezien er in het statisch systeem bij hogere nystatineconcentraties duidelijk minder biofilmvorming optreedt. In de MRDs en de CDC biofilmreactor daarentegen is geen effect merkbaar, omdat naar alle waarschijnlijkheid de continue doorstroming van groeimedum de schijfjes uitloogt. Dit wijst er sterk op dat het effect, geobserveerd in het statisch systeem, een soort "burst" is, waarbij de vrije fractie van het nystatine snel vrijkomt en een kortstondig antimycotisch effect uitoefent. Daarenboven suggereren de diffusie-experimenten op geloogde schijfjes dat er een éénmalige, maar geen vertraagde of verlengde vrijstelling van nystatine is.

5.5. BESLUIT

Nystatine kan worden opgeladen via mengen met ongevulkaniseerd polysiloxaan dat nadien wordt gepolymeriseerd. Een kleine fractie aan “vrij” (beschikbaar) nystatine, proportioneel met de mate van oplading, kan nadien uit de siliconenmatrix diffunderen en een kortstondig antimycotisch effect veroorzaken. De doeltreffendheid daarvan ten opzichte van gistbiofilmvorming is echter laag, aangezien het vrije nystatine snel uitgeput is, waardoor de biofilm niet continu aan antimycoticum wordt blootgesteld. Nystatine kan ook in lage concentraties in polysiloxaan worden opgeladen met behulp van impregnatie, wat echter een beperkt antimycotisch effect oplevert.

6. BESLUITEN

De hoofddoelstelling van dit deel van het proefschrift was de ontwikkeling van een antimycotisch polysiloxaan voor de preventie van gistbiofilmvorming op spraakprothesen.

Hoewel vooral *C. albicans* de prothesen koloniseert, komen meestal meerdere gistspecies samen op een TSP voor. Hierbij worden *C. glabrata* en *C. krusei* voornamelijk in cohabitatie met andere species teruggevonden. *C. parapsilosis* daarentegen komt op een spraakprothese eerder alleen voor. Op basis van de susceptibiliteitsbepalingen zijn de koloniserende gistspecies het meest uniform gevoelig aan nystatine. Daarnaast zijn de azolen, meer bepaald miconazol het actiefst tegen *C. albicans*. Beide AM worden dan ook vooropgesteld als interessant voor de bereiding van antimycotisch polysiloxaan.

Uit de vergelijking van de verschillende kwantificatietechnieken kan worden besloten dat een “surrogaat”-assay op basis van FDA een alternatief is voor de schatting van biomassa via uitplating. De doorvloeisystemen, MRDs en de CDC reactor, blijken goede systemen te zijn voor de in vitro kweek van gistbiofilms, in tegenstelling tot het eerder beschreven statisch systeem in microtiterplaten.

Tenslotte werd vastgesteld dat er uit met nystatine opgeladen polysiloxaan nog actief antimycoticum kan diffunderen, maar dat deze vrijstelling te kort van duur is om gistbiofilmvorming te voorkómen.

DEEL 2: *STREPTOCOCCUS MUTANS* BIOFILMS - TANDPLAK

1. ACHTERGROND

1.1. TANDPLAK

1.1.1. Definitie

Tandplak (Fig. 1.1) bestaat uit een driedimensionaal georganiseerde dynamische structuur van één of meerdere soorten micro-organismen die zich irreversibel aan het tandglazuur vasthechten en daar een extracellulaire matrix vormen (Donlan en Costerton, 2002; Spratt, 2003). Dit type biofilm komt voornamelijk voor tussen en onderaan de tanden (tegen het tandvlees), waar mechanische verwijdering wordt bemoeilijkt.



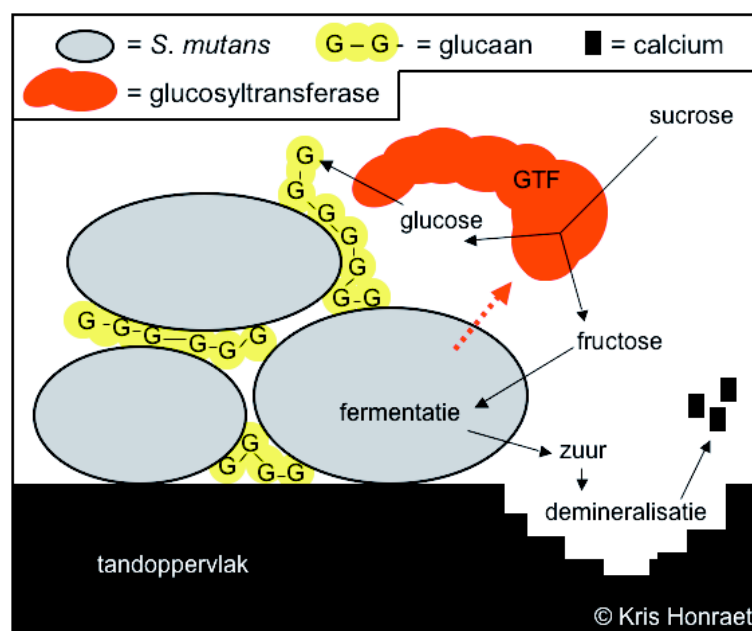
Figuur 1.1. Foto van gekleurde tandplak (Socransky en Haffajee, 2000)

1.1.2. Vorming van tandplak

Onmiddellijk na het poetsen van de tanden ontstaat er op het tandoppervlak een conditioneringfilm die voornamelijk bestaat uit speekselbestanddelen en voedselresten (Rozen et al., 2001; Steinberg en Eyal, 2002). Deze dekkende laag bevat albumine, lysozyme, glyco- en fosfoproteïnen en lipiden die specifieke en aspecifieke adhesieplaatsen vormen voor commensalen, zoals *Streptococcus mutans* (zie 1.2.), uit de mond. Deze adhesie is de start van de biofilm/tandplak-ontwikkeling en duurt slechts enkele minuten (Elvers en Lappin-Scott, 2000; Spratt, 2003).

De geadheerde cellen vermenigvuldigen zich en vormen zo in het beginstadium microkolonies (Overman, 2000). Sommige tandplakbacteriën, zoals *S. mutans* produceren extracellulaire glucosyltransferasen (GTFn). Deze enzymen splitsen sucrose, afkomstig uit de voeding, in fructose en glucose (Fig. 1.2), die op hun beurt aanleiding geven tot, respectievelijk, de vorming van een extracellulaire matrix (glucose) en de productie van melkzuur (fructose).

Na de splitsing van sucrose ondergaat het GTF een conformationele wijziging, wat een overdracht van het afgesplitst glucose naar een dextraanketen mogelijk maakt (Meulenbeld en Hartmans, 2000). Afhankelijk van het soort GTF worden onoplosbare dextranen, oplosbare dextranen of een mengsel van beide gevormd (Matsumara et al., 2003; Meulenbeld et al., 1999; Banas en Vickerman, 2003). De oplosbare dextranen fungeren als primers voor de vorming van onoplosbare dextranen. Deze laatste slaan neer en vormen een soort “sticky matrix” die zorgt voor een sterke binding tussen de groeiende cellen en het tandoppervlak (Spratt, 2003). Dextranen die uitsluitend uit glucose-eenheden bestaan worden ook glucanen genoemd.



Figuur 1.2. Schematische voorstelling van de functie van GTF bij het ontstaan van tandplak en cariës

Het uit sucrose vrijgestelde fructose wordt door de biofilmbacteriën tot melkzuur gefermenteerd, wat leidt tot een pH-daling ($\text{pH} < 4$) (McNeill en Hamilton, 2003) in de omgeving van het tandplak. Deze zure pH zorgt voor een progressieve demineralisatie van het tandoppervlak (Kaufman en Kleinberg, 1973), wat aanleiding geeft tot cariës (zie 1.1.3.). Het GTF wordt dan ook als een bacteriële virulentiefactor in de pathogenese van cariës beschouwd (Vacca-Smith en Bowen, 1998; Mattos-Graner et al., 2000; Duarte et al., 2003).

Wanneer tandplak zich verder ontwikkelt en de kolonies vervloeien tot een dense biofilm, wordt uiteindelijk een steady-state bekomen waarbij de biofilmgroei in evenwicht is met de biofilmreductie door verlies van cellen (Elvers en Lappin-Scott, 2000).

1.1.3. Tandplak-gerelateerde problemen

Cariës (= tandontkalking) is één van de meest voorkomende chronische infecties in het menselijk lichaam (Koo et al., 2003). Tandglazuur is opgebouwd uit hydroxy-apatiet (HAP), een calciumfosfaat dat onoplosbaar is in neutraal waterig milieu. Daarenboven is speeksel bij een neutrale pH oververzadigd aan calcium, fosfor en hydroxylionen, waardoor het HAP in onoplosbare vorm wordt gehouden. Wanneer de bacteriële flora in de diepere lagen van tandplak laagmoleculaire suikers fermenteert, daalt de pH en gaat het tandcalcium toch in oplossing, wat reversibele demineralisatie wordt genoemd (Murchison et al., 1985). Hierdoor komen de onderliggende delen van de tand bloot te liggen en ontstaat tandpijn.

Het tandplak, dat initieel op het tandglazuur ontstaat, kan verder uitgroeien naar de gingiva (= het tandvlees), wat kan ontsteken. Als de ontsteking beperkt blijft tot de rand van het tandvlees wordt gesproken van gingivitis (Sammons, 2003). Gingivitis komt heel frequent voor en is een reversibel probleem dat door een betere orale hygiëne kan worden voorkómen.

Indien tandplak lange tijd niet wordt verwijderd, kunnen Gram-negatieven, zoals *Fusobacterium* en *Porphyromonas* species, prolifereren. Deze produceren endotoxinen die de inflammatie versterken (Sbordone en Bortolaia, 2003). Uiteindelijk degenereert het tandvlees en wordt het kaakbot rondom de wortels van de tanden afgebroken (parodontitis). Deze aandoening is niet reversibel.

Tandvleesontsteking dient vooral door reuma- en hartkleppatiënten te worden vermeden, aangezien de biofilmbacteriën via het tandvlees de bloedbaan kunnen binnendringen en zo op gewrichten, hartkleppen,... biofilms kunnen vormen (Sammons, 2003). Deze biofilms kunnen op hun beurt aanleiding geven tot systemische infecties (Beck et al., 1996).

1.2. STREPTOCOCCUS MUTANS

1.2.1. Taxonomie en eigenschappen

Het genus *Streptococcus* behoort tot de Gram-positieve bacteriën met een laag (<50% mol%) G+C gehalte, het zogenaamde phylum van de ‘*Firmicutes*’. Dit genus wordt verder gerekend tot de klasse van de ‘*Bacilli*’, de orde van de ‘*Lactobacillales*’ en de familie van de ‘*Streptococcaceae*’. Cellen van *Streptococcus* species zijn meestal rond of ovoid, met een diameter kleiner dan 2 µm, en komen voor in paren of ketens wanneer ze in vloeibaar medium worden gegroeid. De meeste zijn chemo-organotroof en hebben een fermentatief metabolisme, waarbij voornamelijk melkzuur wordt geproduceerd.

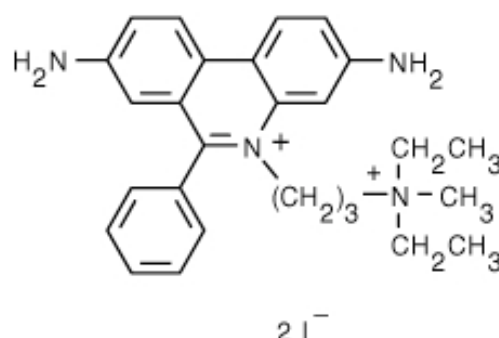
S. mutans wordt beschouwd als een groep van verschillende biovars, serovars en genomovars en behoort tot de orale streptococcen, die voornamelijk vóorkomen in de mond en de bovenste luchtwegen van de mens en dieren. *S. mutans*-cellen hebben een diameter tussen 0.5 en 0.75 µm en komen voor in paren of in korte of middellange ketens en hebben geen capsule. De meeste kunnen groeien onder aërobe omstandigheden, maar hun groei wordt bevorderd door anaërobe condities. *S. mutans* biosynthetiseert diverse extracellulaire polysacchariden uit sucrose die belangrijk zijn voor de kolonisatie van harde oppervlakken in de mond. Deze polysacchariden worden voornamelijk gevormd door de glucosyl- en fructosyltransferasen, geproduceerd door de *S. mutans*-cellen. Het primaire habitat van *S. mutans* is het tandoppervlak van mensen, waarbij de kolonisatie wordt bevorderd door hoge concentraties aan sucrose. (Sneath et al., 1986)

1.2.2. Kwantificatie van *S. mutans*

In Deel 1, 1.2.3. worden de technieken voor de kwantificatie van micro-organismen uitvoerig besproken. Hier worden enkel twee andere “surrogaat”-assays, gebaseerd op binding van 2 fluorochromen (propidiumjodide (PI) en SYTOX[®] Green) op een cellulair element van dode cellen, voor de kwantificatie van micro-organismen besproken.

1.2.2.1. Propidiumjodide

Propidiumjodide (PI) is een fluorochroom dat na binding met DNA een rode fluorescentie geeft. PI (Fig. 1.3.) kan enkel binnendringen in micro-organismen met een beschadigde celmembraan. Hierdoor worden met PI enkel de dode cellen fluorescent gemerkt.



Figuur 1.3. Chemische structuur van propidiumjodide

1.2.2.2. SYTOX[®] Green

SYTOX[®] Green (structuurformule niet beschikbaar) geeft na binding met DNA een groene fluorescentie en kan net zoals PI alleen in micro-organismen met een beschadigde celmembraan binnendringen. Op deze manier worden met SYTOX[®] Green de dode cellen fluorescent gemerkt.

1.3. S. MUTANS BIOFILMS

1.3.1. Situering van *S. mutans* binnen de context van tandplak

Diverse bacteriën, n.l. zo'n 500 verschillende species (Rosan en Lamont, 2000) uit de mondfloor kunnen adheren op het tandoppervlak. Door hun glycocalyx (Mattos-Graner et al., 2004; Wen en Burne, 2002) en de productie van extracellulaire GTFn (Korpela et al., 2002; Matsumura et al., 2003) zijn het vooral de commensale streptococci, zoals *S. mutans* en *S. sanguinis* die het tandoppervlak als eerste koloniseren (Rogers et al., 2001). Daarenboven zorgen deze streptococci voor de cel-cel en cel-oppervlak interacties, die cruciaal zijn voor de biofilmvorming (Marsh, 2003). Zo produceren GTFn van *S. sanguinis* oplosbare glucanen, die als primers dienen voor de glucaanbiosynthese door *S. mutans* (Koo et al., 2000). Deze laatste is een latere kolonisator en is verantwoordelijk voor de "echte" biofilmvorming (Kawashima et al., 2003; Koo et al., 2003). Hierbij produceert *S. mutans* oplosbare en onoplosbare glucanen, waarbij deze laatste de *S. mutans* adhesie bevorderen (Schilling en Bowen, 1992; Ooshima et al., 2001).

Bij lage pH, ontstaan door fermentatie van fructose, hebben zuurtolerante bacteriën, zoals *S. mutans* (Zhu et al., 2001), een competitief voordeel en krijgen de bovenhand op andere, minder schadelijke commensalen (Bradshaw en Marsh, 1999). Aangezien deze zuurproductie ook aanleiding geeft tot cariës wordt *S. mutans* tot de cariogene bacteriën gerekend.

1.3.2. In vitro systemen voor de groei van orale biofilms

In de literatuur zijn diverse systemen beschreven voor de in vitro kweek en karakterisatie van orale biofilms (Tang et al., 2003), zoals een microtiterplaatsysteem (Guggenheim et al., 2001), een groeikamer set-up (Pitten et al., 2003), “flow”-cellen (Christersson et al., 1987; Herles et al., 1994), een “constant depth film fermenter” (Kinnement et al., 1996) en MRDs (Larsen en Fiehn, 1995). Deze laatste onderzoekers bestuderen het effect van de temperatuur, de aanwezigheid van sucrose en chloorhexidine, de coating van de schijfjes met speeksel en de duur van de groeifase op de ontwikkeling van *S. sanguinis* biofilms op polysiloxaan. Donlan et al. (2004) gebruiken de CDC biofilmreactor voor de bepaling van de biomassa en de EPS-concentratie van *S. pneumoniae* biofilms in functie van de tijd.

Zoals bij gistbiofilms (zie Deel 1, 1.3.2.) vertoont uitplating als kwantificatietechniek voor bacteriële biofilmbiomassa een aantal nadelen. Nochtans wordt voornamelijk deze techniek toegepast, hoewel een aantal alternatieven worden beschreven (cfr. Deel 1, 1.3.2.).

1.4. AANPAK VAN TANDPLAK

De aanpak van tandplak kan in twee grote categorieën worden opgedeeld: nl. de preventie en de behandeling van tandplak.

1.4.1. Preventie van tandplak

1.4.1.1. Beperking van sucrose-inname

De beste preventie van tandplak is het gebruik van sucrosebevattende etenswaren tot een minimum beperken. Telkens als de tanden aan sucrose worden blootgesteld, treedt een pH-daling op die bijdraagt tot tanddemineralisatie. Zodra de suikeraanvoer stopt, vermindert ook de zuurvorming en kunnen er opnieuw mineralen worden ingebouwd in de aangetaste tandweefsels (= remineralisatie). Een voldoende lange rustpauze, tussen de innamen van sucrose, is belangrijk aangezien dit het gebit de tijd geeft om zich te

herstellen. Het is dus niet alleen de hoeveelheid sucrose, maar vooral de frequentie van inname die de incidentie van tandplak bepaalt.

1.4.1.2. Sucrosevervangende zoetstoffen

Naast sucrose bestaan er ook niet-cariogene zoetstoffen. Voorbeelden hiervan zijn acesulfaam K, aspartaam en de suikeralcoholen (polyolen) (Park et al., 1995). De polyolen, zoals xylitol, hexitol, sorbitol en mannitol, zijn zoetstoffen die sucrose imiteren en, in tegenstelling tot suikers, minder zure fermentatieproducten opleveren (Trahan, 1995; Hamada et al., 1996). Het nadeel van deze stoffen is dat ze in hoge concentratie laxerend kunnen werken (Dills, 1989).

1.4.1.3. GTF-remming

Naast de beperking van de inname van sucrose en het gebruik van sucrosevervangingsmiddelen is er ook een andere manier om de invloed van sucrose op de tandplakvorming tegen te gaan. Deze antibiofilmstrategie (Duarte et al., 2003; Baehni en Takeuchi, 2003) is gebaseerd op de inhibitie van één van de hoekstenen van tandplakontwikkeling, n.l. de GTFn (Yamashita et al., 1993). Het achterliggend concept is dat wanneer GTF wordt geremd er ook geen “sticky matrix” kan worden gevormd, met een remming van de biofilmontwikkeling tot gevolg. Verschillende stoffen zoals Zn^{2+} -ionen, iminosuikers, sucrose-analogen, detergenten en natuurproducten staan bekend om hun GTF-inhiberende werking (Steinberg et al., 1992; Hamada et al., 1996; Hashimoto et al., 2001; Wunder en Bowen, 1999). Van verschillende natuurproducten, zoals oolong thee (Nakahara et al., 1993), propolis (Koo et al., 2000; Duarte et al., 2003), cacao extract (Ito et al., 2003), groene thee (Hattori et al., 1990), Chinese zwarte thee (Limsong et al., 2004), donker bier (Murata et al., 1995) en hun individuele componenten, zoals apigenine en *tt*-farnesol van propolis (Koo et al., 2003) en polyfenolen van groene thee (Otake et al., 1991) en appels (Yanagida et al., 2000), werd reeds aangetoond dat ze GTF in vitro inhiberen. In gerandomiseerde studies in ratten hebben Otake et al. (1991), Linke en LeGeros (2003) en Ito et al. (2003) een significant cariës reducerend effect van respectievelijk, Sunphenon® (een extract van groene thee), een zwarte thee extract en een cacao extract, aangetoond. Het exact werkingsmechanisme van deze PE is nog niet opgehelderd, maar er wordt verondersteld dat de binding van de polyfenol fractie van deze PE met het GTF de tertiaire structuur van het enzym verstoort, wat resulteert in een functieverlies (Hamilton-Miller, 2001).

1.4.2. Behandeling van tandplak

Ook de behandeling van tandplak kan in twee categorieën worden ingedeeld, nl. de mechanische verwijdering en de chemische bestrijding.

1.4.2.1. Mechanische verwijdering van tandplak

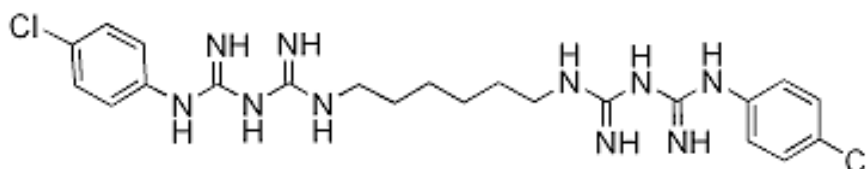
De mechanische verwijdering, i.e. het poetsen en flossen van de tanden, reduceert het aantal koloniserende bacteriën en de biofilmvorming. Het verhindert de accumulatie van tandplak en verstoort de anaërobe condities die van belang zijn voor de groei van de pathogene micro-organismen die tot gingivitis en parodontitis leiden. De duur en frequentie van het poetsen zijn sleutelfactoren bij een efficiënte aanpak van tandplak (Cummins, 1997).

1.4.2.2. Chemische bestrijding

Een chemische bestrijding van tandplak komt neer op het gebruik van antimicrobiële middelen, zoals de kationische, anionische en niet-ionogene stoffen. Helaas verstoren deze stoffen de mondflora, wat aanleiding kan geven tot secundaire infecties. Daarenboven vertonen de biofilmbacteriën een hoge resistentie tegen deze middelen (Pitten et al., 2003; Larsen en Fiehn, 1995, 1996; Larsen et al., 1997; Wilson, 1996), wat hun doeltreffendheid in vraag stelt.

1.4.2.2.1. *Kationische stoffen*

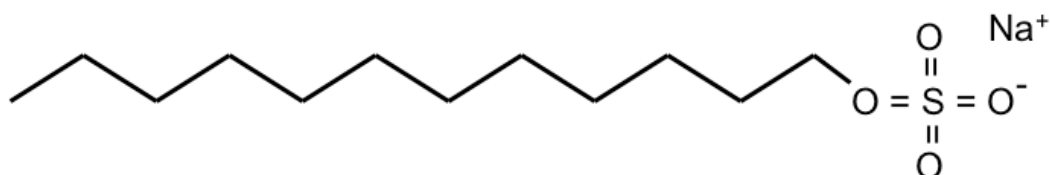
De meest gebruikte middelen, waarvan chloorhexidine (Fig. 1.4.) het bekendste is, vallen onder de noemer van kationische stoffen. Zij zijn positief geladen en worden tot het negatief geladen membraan van de biofilmbacteriën aangetrokken. Door de interactie met het membraan verhogen deze stoffen de permeabiliteit ervan, wat leidt tot lekkage van essentiële moleculen uit het micro-organisme en celdood (Jones, 1997).



Figuur 1.4. Chemische structuur van chloorhexidine

1.4.2.2.2. Anionische stoffen

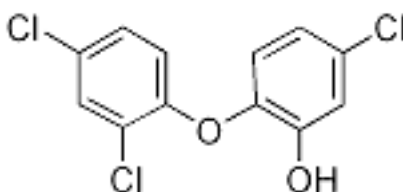
De werking van anionische middelen (bvb. natriumlaurylsulfaat, Fig. 1.5.) is voornamelijk gebaseerd op een concurrentie met de negatief geladen bacteriën voor bindingsplaatsen op de conditioneringlaag op de tanden. Daarnaast werken ze ook membraandestabiliserend. Fluoride heeft een ander werkingsmechanisme en wordt al decennia lang gebruikt omwille van zijn cariësreducerende eigenschappen. In lage concentraties is het voornamelijk werkzaam als tandverstevigingsmiddel in het mineralisatie-demineralisatieproces (Sammons, 2003). In hogere dosissen remt het de bacteriële groei door inhibitie van diverse bacteriële enzymen, zoals katalasen en peroxidasen (Bradshaw et al., 2002).



Figuur 1.5. Chemische structuur van natriumlaurylsulfaat

1.4.2.2.3. Niet-ionogene middelen (fenolen)

De fenolen (pKa van fenol = 10) zijn bij fysiologische pH niet geladen, maar danken hun activiteit aan hun amfifiel karakter, waardoor ze het bacteriële membraan kunnen penetreren (Greenman et al., 1997). De precieze werkwijze is nog niet helemaal opgehelderd, maar het is wel bekend dat ze in hoge concentraties membraanlekkage en cellyse kunnen veroorzaken. Triclosan (Fig. 1.6.) is het meeste gekende voorbeeld van deze groep, dat tegen tandplak wordt gebruikt (Sullivan et al., 2003).



Figuur 1.6. Chemische structuur van triclosan

2. SPECIFIEKE OBJECTIEVEN

De huidige preventieve strategieën zijn ontoereikend om tandplakvorming efficiënt tegen te gaan. Er is dus behoefte aan alternatieven die beter zijn afgestemd op het biofilmkarakter van tandplak. Deze nieuwe strategieën kunnen aangrijpen op het oppervlak, de micro-organismen of de extracellulaire matrix. Coating van tanden met stoffen die de adhesie van bacteriën tegengaan en/of een antimicrobieel effect uitoefenen blijft vooralsnog een theoretische optie. Inhibitoren van de QS (zie algemene inleiding, 4.2.) zouden de vorming van de biofilms en de virulentie van *S. mutans* (zuurtolerantie) beïnvloeden en selectiever werken dan antimicrobiële stoffen die de bacteriën afdoden. Een derde mogelijkheid, waarvoor in dit proefschrift werd geopteerd, is het gebruik van natuurproducten die de eps-biosynthese remmen, waardoor er geen biofilm kan worden gevormd.

Veel plantenextracten (PE) inhiberen GTF, maar hun toepasbaarheid voor de remming van *S. mutans*-biofilmvorming op HAP werd nog niet systematisch onderzocht. Overigens werd het verband tussen de inhibitie van het GTF en de remming van de biofilmvorming door de PE nog niet ontegensprekelijk bewezen. Voor het in vitro onderzoek van deze effecten zijn 2 “tools” vereist:

1. Modelsystemen voor de groei en kwantificatie van *S. mutans* biofilms op HAP
2. Een enzymassay om de activiteit van GTF te bepalen

Voor geselecteerde PE, die de biofilmvorming door *S. mutans* op HAP remmen, wordt nagegaan of dit effect aan de inhibitie van het GTF kan worden toegeschreven.

.

3. SYSTEMEN VOOR IN VITRO BIOFILMGROEI DOOR *S. MUTANS*

De ontwikkeling van modelsystemen voor de studie van biofilmgroei door *S. mutans* omvat twee aspecten. Ten eerste is het nodig om de biomassa van *S. mutans* te kwantificeren. Hiertoe worden een aantal technieken getest op suspensies van *S. mutans* (3.1). Ten tweede worden een aantal systemen/procedures ontwikkeld om *S. mutans* biofilms op een reproduceerbare manier te kweken (3.2).

3.1. KWANTIFICATIE VAN PLANKTONISCHE CELLEN

3.1.1. Principe

In dit experimenteel deel worden een aantal “surrogaat”-assays (zie Deel 1, 1.2.3. en Deel 2, 1.2.2.) voor de kwantificatie van levende en dode micro-organismen op planktonische *S. mutans*-cellen toegepast. Hiertoe wordt telkens een verdunningsreeks van bacteriële cellen gemaakt, waarna het aantal cellen in elke verdunning wordt bepaald via uitplating (als referentietechniek) en met behulp van een “surrogaat”-assay. De respons van elke techniek wordt vervolgens in functie van het log aantal cellen uitgezet. Tenslotte wordt het visueel-geschatte lineair bereik, i.e. het gebied waar een lineair verband bestaat tussen het log aantal cellen en de respons, van de respectievelijke assays met elkaar vergeleken.

3.1.2. Materialen en methoden

3.1.2.1. Verdunningsreeksen

In alle experimenten wordt *S. mutans* LMG 14558^T gebruikt. Na overnacht incubatie bij 37°C van 6 centrifugeerbuisjes met 10 ml geënte Brain Heart Infusion bouillon (BHI; BD) worden de cellen geoogst door middel van centrifugatie (4 min, 4000 rpm). De “pellet” wordt driemaal gewassen met het medium waarmee in de desbetreffende procedure wordt gewerkt, n.l. FW (voor het SYTO[®] 9-, PI- en SYTOX[®] Green-assay) of PBS (voor het FDA-assay). Vervolgens worden de cellen gehersuspendeerd in 1 ml van het gebruikte medium. De inhoud van alle 6 buisjes wordt samengevoegd, wat resulteert in de startsuspensie. Deze laatste wordt vervolgens 7 maal sequentieel 1:10 verdund in het gebruikte medium. Een buisje met 9 ml van het gebruikte medium dient als controle bij ieder assay.

3.1.2.2. Kwantificatietechnieken

Voor het FDA-assay wordt verwezen naar Deel 1, 4.1.2.2.3. Hier wordt wel een kleine wijziging aangebracht, er worden namelijk slechts 8 kuipjes gevuld met celsuspensie en 1 kuipje dient als controle.

3.1.2.2.1. *Uitplating*

Telkens na het opstellen van een verdunningsreeks wordt 1 ml van de laatste 4 verdunningen uitgeplaat via de plaatgietmethode op Brain Heart Infusion Agar (BHIA; BD). De platen worden 48 uur geïncubeerd bij 37°C, waarna het aantal kolonies op iedere plaat wordt geteld.

3.1.2.2.2. *SYTO[®] 9-assay*

De gevolgde procedure voor het SYTO[®] 9-assay is analoog aan die beschreven in Deel 1, 4.1.2.2.4. De enige verschillen met het eerder beschreven assay zijn dat hier 200 µl celsuspensie in FW of enkel FW, als controle, in ieder kuipje wordt gebracht en dat aan elk kuipje 10 µl van een 3:100 verdunning van SYTO[®] 9 in FW wordt toegevoegd. Het assay wordt in drievoud uitgevoerd op levende cellen. Ook wordt een fluorescente “kleuring” uitgevoerd op afgedode cellen. Hiertoe worden de verdunde celsuspensies 30 min bij 80°C geplaatst, waarna de dode cellen op dezelfde manier als hierboven worden behandeld.

3.1.2.2.3. *PI-assay*

Dit assay wordt eveneens uitgevoerd op zowel dode als levende cellen in dezelfde microtiterplaten als het SYTO[®] 9-assay. Hier wordt opnieuw 200 µl celsuspensie of enkel FW in ieder kuipje gebracht, waaraan vervolgens 10 µl van een 3:100 verdunning van PI (5 mM in water; Molecular Probes Inc.) in FW wordt toegevoegd. De microtiterplaat wordt gedurende 15 min op een schudplaat in het donker geïncubeerd, waarna de fluorescentie wordt gemeten met een microtiterplaatlezer bij een excitatie- en emissiegolflengte van respectievelijk 535 ±25 nm en 630 ±10 nm.

3.1.2.2.4. SYTOX[®] Green-assay

Ook het SYTOX[®] Green-assay wordt toegepast op dode en levende cellen in dezelfde microtiterplaten als het SYTO[®] 9-assay. Aan 200 μ l celsuspensie wordt hier 10 μ l van een 3:100 verdunning in FW van SYTOX[®] Green (5 mM in DMSO; Molecular Probes Inc.) toegevoegd. Opnieuw wordt 15 min op een schudplaat geïncubeerd in het donker. De fluorescentie wordt gemeten met een microtiterplaatlezer bij een excitatie- en emissiegolflengte van respectievelijk 486 ± 10 en 535 ± 25 nm.

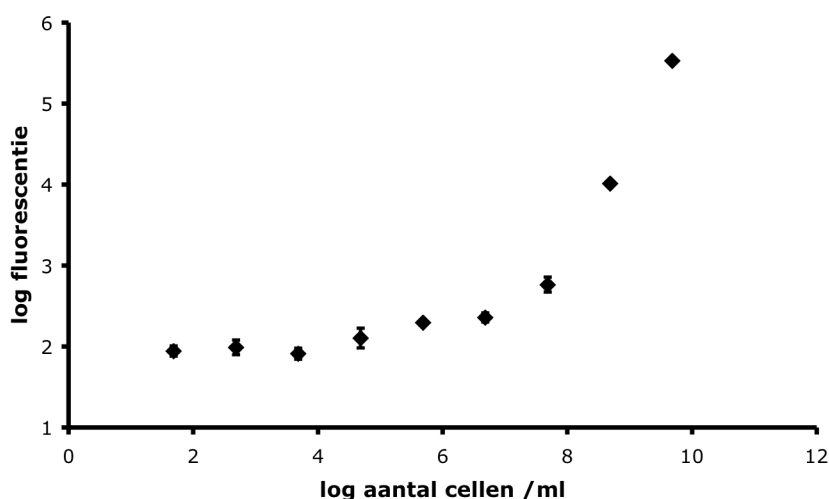
3.1.2.3. Statistische analyse

Op de resultaten van het SYTO[®] 9-assay uitgevoerd op levende cellen wordt met behulp van SPSS 11.0 software een UNIANOVA uitgevoerd met de log fluorescentie als respons, het “experimentnummer” als “random” factor en het log aantal cellen als covariate.

3.1.3. Resultaten

3.1.3.1. Het FDA-assay

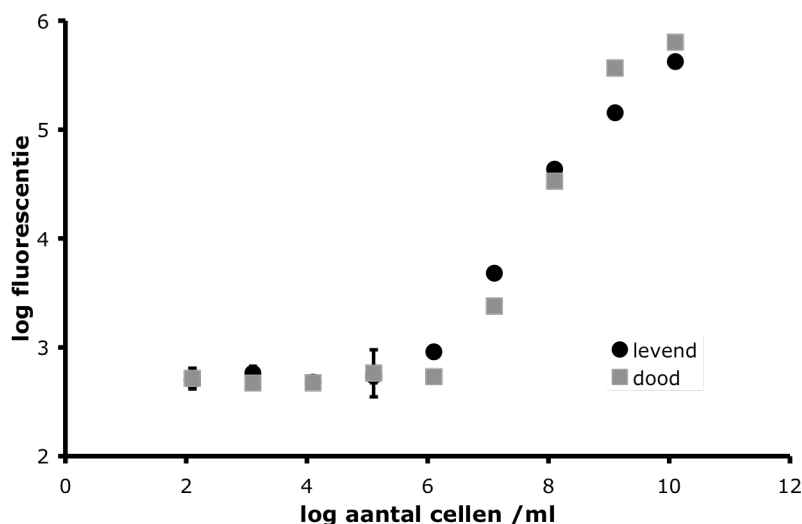
Fig. 3.1. illustreert dat de log fluorescentierespons bij het FDA-assay constant (± 2 log fluorescentie-eenheden [FE]) blijft tot ongeveer 10^7 cellen/ml. Vanaf dit punt stijgt de respons quasi lineair in functie van het log aantal cellen.



Figuur 3.1. Log fluorescentie \pm SD in functie van het log aantal cellen voor het FDA-assay, toegepast op *S. mutans* (n=3)

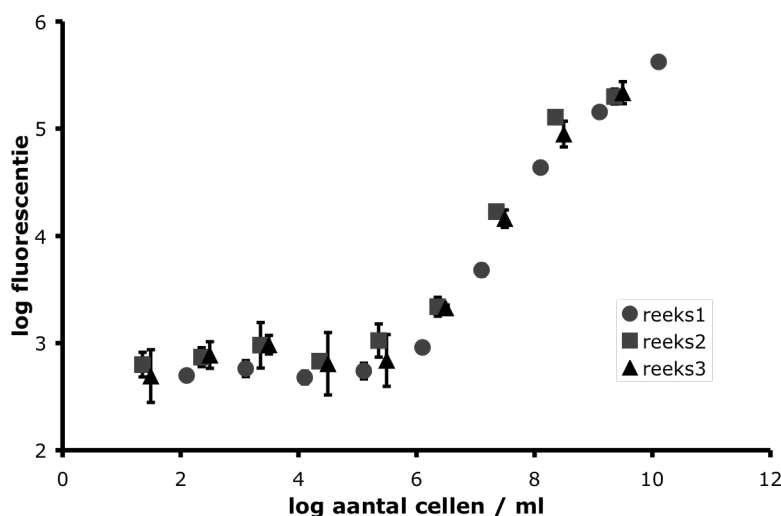
3.1.3.2. Het SYTO[®] 9-assay

Voor de SYTO[®] 9 fluorescente “kleuring” is in Fig. 3.2. duidelijk te zien hoe de fluorescentiewaarden eerst een constant verloop vertonen (<3 log FE) in functie van zowel het log aantal levende als afgedode cellen/ml. Beide responscurven vertonen een nagenoeg lineaire stijging vanaf ongeveer 10^6 tot 10^7 cellen/ml.



Figuur 3.2. Log fluorescentie \pm SD in functie van het log aantal levende en afgedode cellen voor het SYTO[®] 9-assay, toegepast op *S. mutans* (n=3)

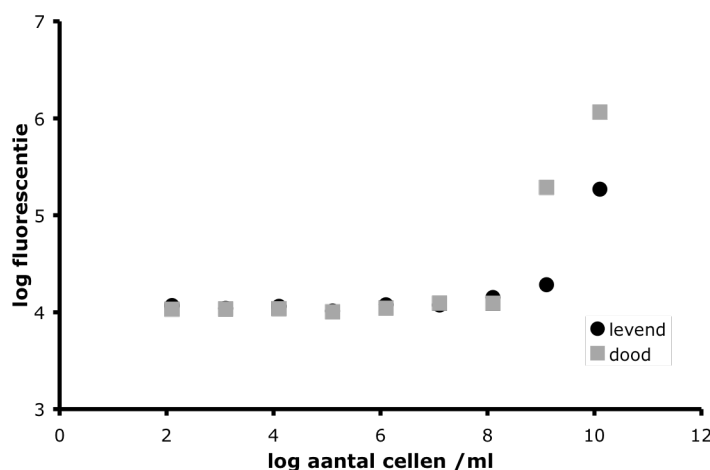
De responscurven, bekomen voor levende cellen (Fig. 3.3.) afkomstig van 3 onafhankelijke experimenten, vertonen een gelijkaardig verloop (vergelijk met Fig. 3.2.). Een UNIANOVA statistiek uitgevoerd op deze curven toont aan dat er geen significant ($P > 0.1$) verschil is tussen de drie curven. De VC bedraagt 9.1%.



Figuur 3.3. Log fluorescentie \pm SD in functie van het log aantal cellen voor het SYTO[®] 9-assay, toegepast op *S. mutans*, in drie onafhankelijke experimenten (n=3)

3.1.3.3. Het PI-assay

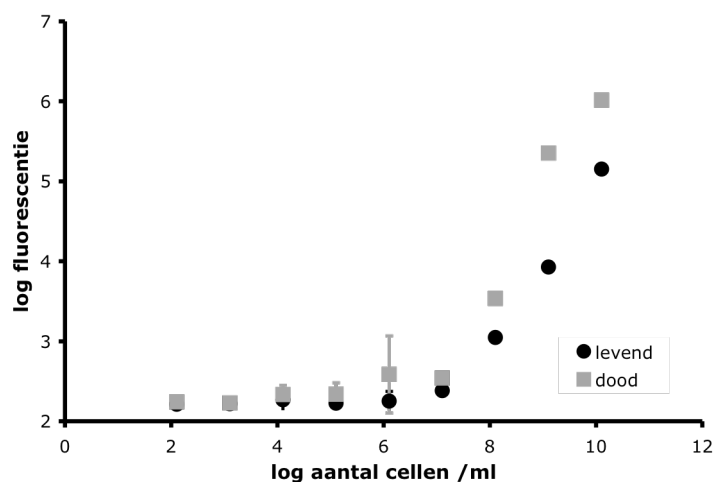
De log fluorescentierespons van met PI gemerkte afgedode cellen blijft constant (± 4 log FE) tot ongeveer 10^8 cellen/ml. Boven deze waarde stijgt de respons \pm lineair in functie van het log aantal cellen/ml. Bij levende cellen blijft de respons constant tot 10^9 cellen/ml. Bij dit aantal beginnen de log fluorescentiewaarden te stijgen met ongeveer dezelfde helling als voor de dode cellen (Fig. 3.4.).



Figuur 3.4. Log fluorescentie \pm SD in functie van het log aantal levende en dode cellen voor het PI-assay, toegepast op *S. mutans* (n=3)

3.1.3.4. SYTOX[®] Green-assay

Zoals in Fig. 3.5. te zien is blijven de log fluorescentiewaarden na fluorescente "kleuring" van de cellen met SYTOX[®] Green constant (± 2 FE) tot ongeveer 10^7 levende cellen/ml. Daarna stijgt de respons quasi lineair in functie van het log aantal cellen/ml. Bij de afgedode cellen wordt een analoog verloop bekomen, maar stijgt het "lineaire" gedeelte sneller, d.w.z. de helling is steiler.



Figuur 3.5. Log fluorescentie \pm SD in functie van het log aantal levende en dode cellen voor het SYTOX[®] Green-assay, toegepast op *S. mutans* (n=3)

3.1.4. Bespreking

In het FDA-assay wordt vanaf $\pm 10^7$ cellen/ml een quasi lineaire stijging van de fluorescentie respons in functie van het log aantal cellen bekomen. Het lineair bereik wordt geschat op 2 log eenheden, van $10^7 - 10^9$ cellen/ml. Het SYTO[®] 9-assay, toegepast op levende cellen, heeft een lineair bereik van $10^6 - 10^{10}$ cellen/ml (4 log eenheden), wat duidelijk beter is dan dat van het FDA-assay. Bovendien vertoont dit assay een goede herhaalbaarheid (cfr. de afwezigheid van een significant verschil tussen de drie experimenten en de lage VC).

Wanneer het SYTO[®] 9-assay wordt toegepast op dode cellen blijken deze nagenoeg dezelfde respons te geven als de levende cellen. Dit is in overeenstemming met het principe van de SYTO[®] 9 fluorescente “kleuring”, die zowel levende als dode cellen merkt. Voor het PI en SYTOX[®] Green-assay beslaat het lineair bereik voor de kwantificatie van dode cellen, respectievelijk, $10^8 - 10^{10}$ cellen/ml en $10^7 - 10^9$ cellen/ml, telkens 2 log eenheden, wat veel lager is dan het bereik van het SYTO[®] 9-assay.

3.1.5. Besluit

Onder de “surrogaat”-assays is het SYTO[®] 9-assay het meest geschikt als kwantificatietechniek voor *S. mutans* biomassa. Dit assay heeft een geschat lineair bereik (voor planktonische cellen) van $10^6 - 10^{10}$ cellen/ml. Wel moet in rekening worden gebracht dat met behulp van deze techniek zowel de dode als levende cellen worden bepaald. De selectieve kwantificatie van dode cellen in aantallen, die te verwachten zijn na inwerking van een antimicrobiële stof, is met de PI- en SYTOX[®] Green-assays niet mogelijk.

3.2. EVALUATIE VAN 3 IN VITRO BIOFILMSYSTEMEN

3.2.1. Principe

Er worden drie systemen gebruikt om *S. mutans* biofilms in vitro te groeien, een statisch systeem, MRDs en de CDC biofilmreactor. Eerst worden met behulp van het statisch systeem de beste omstandigheden voor biofilmgroei van *S. mutans* bepaald. Vervolgens worden de beide doorvloeisystemen aangewend om biofilms van *S. mutans* te kweken.

3.2.2. Materialen en methoden

3.2.2.1. Schijfjes, stam en media

In het statisch systeem en de MRDs worden HAP-schijfjes (Clarkson Chromatography products, South Williamsport, PA, USA) gebruikt (Hope et al., 2002). Deze worden geschuurd met silicacarbidepapier (korrelgrootte 400) en geautoclaveerd vóór gebruik (Guggenheim et al., 2001). In de CDC reactor worden siliconenschijfjes gebruikt (zie Deel 1, 4.2.2.3.). In alle experimenten wordt gewerkt met *S. mutans* LMG 14558^T. De biofilms worden gegroeid in BHI, BHI gesupplementeerd met 1% sucrose (BHIS) en BHI 1:10 met 1% sucrose (BHI10S).

3.2.2.2. Statisch systeem

In het statisch systeem worden *S. mutans* biofilms gegroeid op HAP-schijfjes in microtiterplaten. De invloed van een aantal parameters, zoals de preconditionering van het HAP met kunstmatig speeksel (KS), de celdensiteit van het inoculum, de incubatietijd en het groeimedium, op de biofilmvorming wordt nagegaan.

3.2.2.2.1. *Inoculum*

Van een overnachtcultuur van *S. mutans* in 10 ml BHI worden de cellen geoogst door middel van centrifugatie (4000 rpm, 4 min). De “pellet” wordt vervolgens driemaal gewassen met 1 ml FW en gehersuspendeerd in 6 ml FW. Deze suspensie wordt spectrofotometrisch gestandaardiseerd door de OD bij 660 nm op 1 te brengen. De resulterende suspensie, het inoculum, komt overeen met een celdensiteit van ongeveer 10^7 cellen per ml.

3.2.2.2.2. Algemene procedure

De steriele HAP-schijfjes worden in een 24-well weefselcultuur microtiterplaat gelegd, waarna aan ieder kuipje 500 µl inoculum wordt toegevoegd. Vervolgens wordt de plaat 1 uur bij 37°C geïncubeerd (adhesiefase). Na de adhesiefase worden de schijfjes tweemaal gespoeld met 1 ml FW en finaal bedekt met 1 ml BHIS. De microtiterplaat wordt opnieuw bij 37°C geplaatst en 24 uur geïncubeerd, om de geadheerde bacteriën een biofilm te laten vormen. Na de incubatie worden de schijfjes opnieuw gespoeld met 1 ml FW en wordt tenslotte de biomassa bepaald met behulp van uitplating en het SYTO[®] 9-assay.

3.2.2.2.3. Invloed van een conditioneringlaag

Om de invloed van een conditioneringlaag op de biofilmvorming na te gaan worden biofilms gegroeid op met KS gecoate HAP-schijfjes. Hiertoe worden 3 steriele HAP-schijfjes voorafgaand in 1 ml KS (1 g Lab-Lemco poeder, 5 g proteose pepton, 2 g gistextract, 0.35 g NaCl, 0.20 g CaCl₂, 0.20 g KCl, 0.5 g mucine per liter MilliQ water) in een eppendorfbuisje gebracht (Badawi et al., 2003). Drie andere worden in 1 ml FW ondergedompeld. Alle buisjes worden vervolgens 1 uur in een DYNAL-mixer (Dynal Biotech, Oslo, Noorwegen) geplaatst bij 37°C. Na deze voorbehandeling wordt op de zes schijfjes een biofilm gegroeid volgens de bovenstaande algemene procedure. De biomassa van twee van de schijfjes, voor elke voorbehandeling, wordt nadien bepaald met behulp van het SYTO[®] 9-assay. De biomassa van de andere schijfjes wordt bepaald via uitplating.

3.2.2.2.4. Invloed van de celdensiteit van het inoculum

Biofilms worden gegroeid uitgaande van inocula met verschillende celdensiteiten. Hiertoe wordt een overnachtcultuur van *S. mutans* in BHI gecentrifugeerd, de “pellet” wordt tweemaal met 1 ml FW gewassen en in 5 ml FW gehersuspendeerd. Vervolgens wordt deze stocksuspensie 8 maal sequentieel 1:10 verdund in FW, waarna de 5 laatste verdunningen worden uitgeplaat op BHIA. Deze 8 verdunningen worden samen met de stocksuspensie gebruikt als inoculum om op 9 steriele HAP-schijfjes een biofilm te groeien, zoals beschreven in de algemene procedure. Als controle wordt ook een schijfje meegenomen dat met 500 µl FW wordt geïnoculeerd. De biomassa op de schijfjes wordt bepaald met behulp van het SYTO[®] 9-assay.

3.2.2.2.5. Biofilmvorming in functie van de tijd en van het groeimedium

Om de invloed van sucrose op de biofilmvorming na te gaan worden biofilms gegroeid in BHI en BHIS. Daarnaast wordt FW als controle meegenomen. Hiertoe worden 20 steriele HAP-schijfjes geïnoculeerd, zoals beschreven in de algemene procedure. Na de adhesiefase en spoelen, wordt van 1 schijfje de biomassa bepaald met behulp van uitplating, een ander schijfje wordt aan het SYTO[®] 9-assay onderworpen. Van de overblijvende schijfjes worden er telkens 6 ondergedompeld in respectievelijk BHIS, BHI en FW, zoals beschreven in de algemene procedure. Vervolgens wordt na 4, 7 en 24 uur incubatie per medium telkens de biomassa van 1 schijfje bepaald met uitplating en van een tweede schijfje met behulp van het SYTO[®] 9-assay.

3.2.2.3. De MRDs

3.2.2.3.1. De opstelling

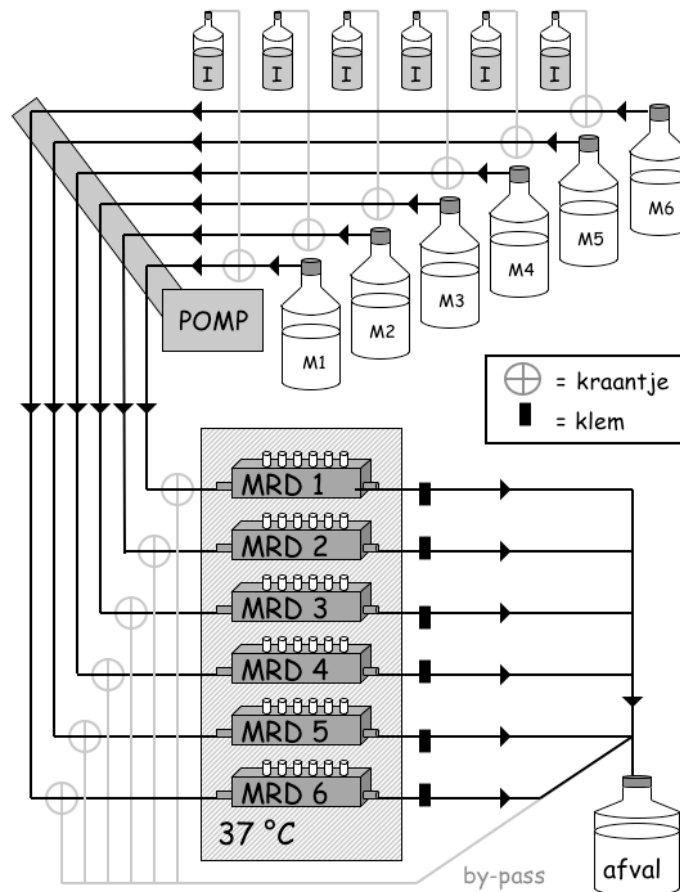
Zes commercieel-beschikbare MRDs (Tyler Research, Edmonton, Alberta, Canada) worden aangewend om *S. mutans* biofilms op HAP-schijfjes te kweken. Elke MRD (Fig. 3.6.) bevat 6 individuele poorten in een lineaire opstelling waarin plugs passen die op hun beurt HAP-schijfjes kunnen herbergen. Na insertie maken de HAP-schijfjes integraal deel uit van de binnenwand van de toestellen.



Figuur 3.6. Foto's van een commerciële MRD

Vóór elke run worden de leidingen, kraantjes en MRDs gewassen en met elkaar verbonden. Vervolgens worden de geschuurde en gewassen HAP schijfjes in de plugs gekleefd met een niet-bactericied siliconenmateriaal. De 6 circuits worden daarna geautoclaveerd en in de opstelling geplaatst, zoals weergegeven in Fig. 3.7. Voor de thermostatisatie van de opstelling worden de MRDs in een aluminiummantel (Centrale Werkplaats, Faculteit Wetenschappen, Universiteit Gent) geplaatst die verbonden wordt met een cryostaat (F25HD, Julabo, Labortechnik GMBH, Seelbach, Duitsland). De leidingen worden vervolgens aangesloten op de flessen met de verschillende groeimedia,

de afvalfles en de peristaltische pomp. Ieder circuit heeft een kraantje vóór en na de pomp. Het kraantje vóór de pomp dient om het inoculum of de media over de toestellen te brengen. Het kraantje na de pomp dient als bypass om de lucht en het resterende inoculum, dat niet in de toestellen zit, tijdens de adhesiefase uit de leidingen te spoelen.



Figuur 3.7. Schematisch voorstelling van het MRD systeem (I = inoculum, M1-6 = groeimedia)

3.2.2.3.2. De inoculatiefase

Van 7 overnachtculturen van *S. mutans* in 10 ml BHI worden de cellen geoogst met behulp van centrifugatie (4000 rpm, 4 min). De “pellets” worden driemaal gewassen met 1 ml FW en gehersuspendeerd in 1 ml FW. De 7 suspensies worden samengevoegd en van deze stocksuspensie ($\pm 10^8$ cellen/ml) wordt telkens 1 ml overgebracht in een fles met 399 ml FW. De 6 flessen (de inocula) worden aseptisch aangesloten (in de LAF-kast) op de leidingen (Fig. 3.7) en de kraantjes worden zo gedraaid dat het inoculum (en daarvoor de lucht uit de leidingen) door de toestellen wordt gepompt. Wanneer alle lucht uit de toestellen is gepompt en deze laatste gevuld zijn met inoculum, worden de klemmen na de MRDs dichtgedraaid, de toestellen omgekeerd (om de adhesie te bevorderen) en de kraantjes vóór de toestellen en vóór de pomp gedraaid om met behulp van de media het

inoculum via de bypass uit de leidingen te spoelen. Het inoculum blijft 1 uur in de toestellen, waarna de toestellen opnieuw worden omgekeerd, de klemmen worden geopend en de tweede reeks kraantjes wordt gedraaid om de doorstroming van de groeimedia te starten.

3.2.2.3.3. *De groeifase*

De groeimedia worden aan een debiet van 40 ml/uur doorheen de MRDs gepompt. Na 24 uur groeien (de groeifase) wordt de pomp gestopt en worden de plugs uit de toestellen gehaald. De HAP-schijfjes worden vervolgens uit de plugs genomen en de daarop aanwezige biofilms worden gekwantificeerd met behulp van het SYTO[®] 9-assay.

In een eerste run wordt de variabiliteit tussen de toestellen bepaald. Hiertoe worden de 6 circuits met BHIS bevoeid tijdens de groeifase. In een tweede run wordt de invloed van sucrose op de biofilmvorming nagegaan. Hiertoe worden drie circuits met BHI en 3 met BHIS bevoeid tijdens de groeifase. In Fig. 3.8. is de opstelling weergegeven.



Figuur 3.8. Foto van de MRD opstelling in het laboratorium

3.2.2.4. De CDC biofilmreactor

Voor een beschrijving van de opstelling van de CDC biofilmreactor wordt naar Deel 1, 4.2.2.4.3. verwezen.

3.2.2.4.1. *De inoculatiefase*

Twee overnachtculturen van *S. mutans* in BHI worden gecentrifugeerd (4000 rpm, 4 min). De “pellets” worden tweemaal gewassen met 1 ml FW, gehersuspendeerd in 1 ml FW en het geheel wordt toegevoegd aan 500 ml BHIS. Dit inoculatiemedium wordt aseptisch

overgebracht in de reactor, waarvan de afvoerleiding is afgeklemd. Vervolgens wordt de reactor op de roereenheid geplaatst (80 rpm) en de twee poorten van de dubbele wand worden met de cryostaat verbonden. Na de verwijdering van de klem op de afvoerleiding start de inoculatiefase.

3.2.2.4.2. *De groeifase*

Na 2 uur (= de inoculatiefase) wordt de peristaltische pomp aangeschakeld (400 ml/uur), die zorgt voor de aanvoer van het groeimedium (BHI10S) naar de reactor. De bemonstering van de schijfjes gebeurt na de inoculatiefase en na 3, 19 en 25 uur groeifase. Hierbij worden telkens 2 staven uit de reactor gehaald. De biomassa op de schijfjes van de ene staaf wordt bepaald door uitplating, terwijl de schijfjes van de andere staaf aan het SYTO[®] 9-assay worden onderworpen. Er worden verse steriele schijfjes aseptisch in de staven geplaatst, die op hun beurt opnieuw in de reactor worden gebracht. Hierdoor wordt de vloeistofstroom binnen de reactor niet verstoord. De nieuwe schijfjes worden echter verder niet geanalyseerd.

3.2.2.5. Kwantificatie van de biomassa

Voor de uitplating worden de met biofilm overgroeide schijfjes eerst in 10 ml BHI gebracht en achtereenvolgens tweemaal aan 30 s vortex-mixen en 30 s sonicatie onderworpen om de biofilmcellen los te maken (Heersink, 2003). Vervolgens worden de bekomen celsuspensies 8 maal sequentieel 1:10 verdund in BHI en 1 ml van elke verdunning wordt uitgeplaat op BHIA. Na 48 uur incubatie bij 37°C wordt het aantal kolonies op elke plaat geteld en wordt het aantal KVE op ieder schijfje berekend. De resultaten worden als “aantal cellen per schijfje” uitgedrukt, wat equivalent is met “aantal KVE per schijfje”.

Voor het SYTO[®] 9-assay wordt ieder schijfje in een zwarte 24-well microtiterplaat gelegd, waarna in ieder kuipje 500 µl FW wordt gebracht. Hieraan wordt 50 µl van een 1:30 verdunning van SYTO[®] 9 in FW toegevoegd. Na 15 min incubatie op een schudplaat in het donker wordt de fluorescentie gemeten met de microtiterplaatlezer, bij een excitatie- en emissiegolflengte van respectievelijk 486 ± 14 en 535 ± 25 nm, in scanningmodus. Hierbij worden 80 fluorescentiespots gemeten per kuipje, waarvan uiteindelijk slechts de 16 (voor de HAP-schijfjes) of 32 (voor de siliconenschijfjes), die binnen het oppervlak van het schijfje vallen, worden weerhouden om een gemiddelde fluorescentie te berekenen.

3.2.2.6. Statistische analyse

Waar mogelijk worden de resultaten statistisch vergeleken met One-Way en UNI ANOVA statistieken en SPSS 11.0 software. Hierbij wordt telkens vertrokken van het meest gecompliceerd statistisch model (met alle factoren en interactietermen), waarna via een “backward-step” methode de niet-significante termen uit het model worden gehaald en het model opnieuw op de data wordt toegepast.

3.2.3. Resultaten

3.2.3.1. Statisch systeem

3.2.3.1.1. *Invloed van een conditioneringlaag*

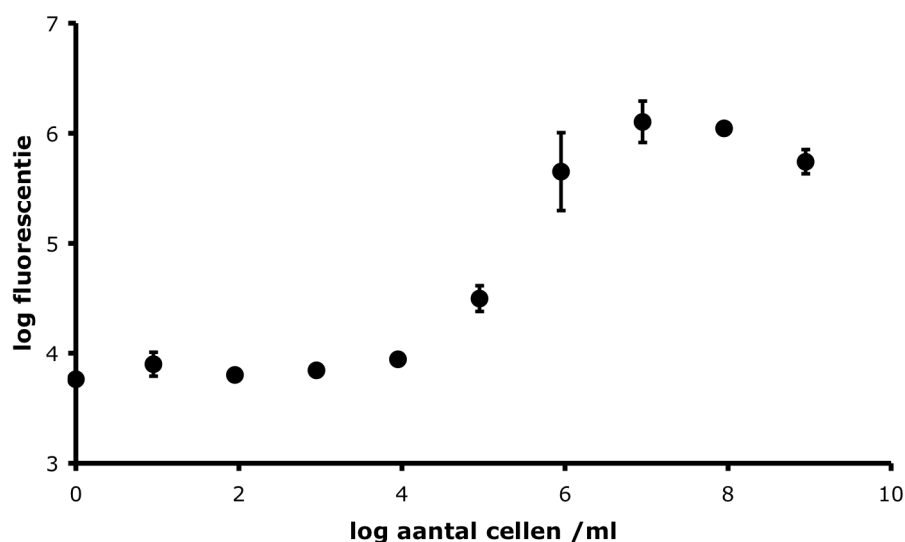
De resultaten van de run met betrekking tot de voorbehandeling van de HAP-schijfjes (zie Tabel 3.1.) suggereren dat de log fluorescentierespons niet noemenswaardig verschilt tussen de schijfjes die worden voorbehandeld met FW of KS. Ook het verschil in log aantal cellen tussen de biofilms gegroeid in aan- of afwezigheid van een speekselcoating is gering (0.44 log eenheden).

Tabel 3.1 Log fluorescentie en log aantal cellen van *S. mutans* biofilms gegroeid op HAP-schijfjes met en zonder voorbehandeling met KS

	respons	
	log FE (n=2) ± SD	log aantal cellen (n=1)
gecoat met KS	5.96 ±0.05	8.95
gecoat met FW	5.95 ±0.01	8.51

3.2.3.1.2. *Invloed van de celdensiteit van het inoculum*

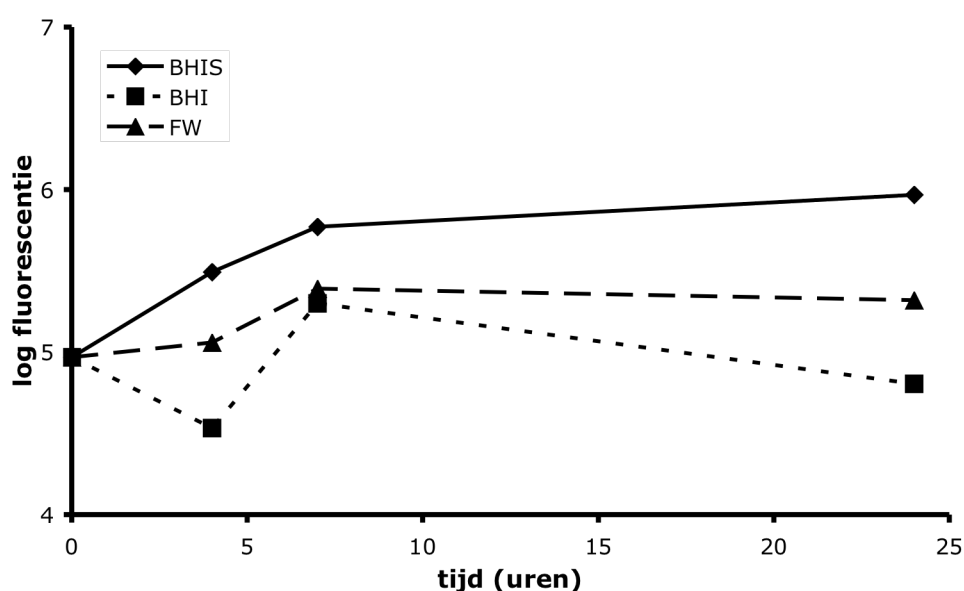
Uit Fig. 3.9. blijkt dat de log fluorescentierespons van de met SYTO[®] 9 gemerkte *S. mutans* biofilms in functie van de celdensiteit van het inoculum een constant verloop vertoont (< 4 log FE) tot ongeveer 10⁴ cellen/ml. Daarna stijgt de respons tot een quasi plateau bij ongeveer 6 log FE vanaf 10⁷ cellen/ml.



Figuur 3.9. Log fluorescentie \pm SD van met SYTO[®] 9 gemerkte *S. mutans* biofilms, gekweekt in het statisch systeem, in functie van de celdensiteit van het inoculum (n=3)

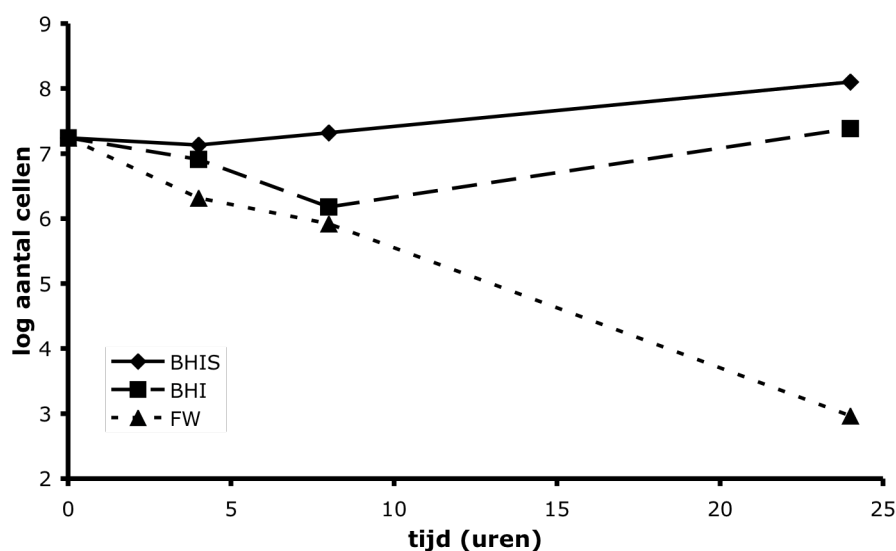
3.2.3.1.3. Biofilmvorming in functie van de tijd en van het groeimedium

In Fig. 3.10 worden de log fluorescentiewaarden bekomen met het SYTO[®] 9-assay van de *S. mutans* biofilms in functie van hun incubatietijd in respectievelijk BHIS, BHI en FW weergegeven. Na de adhesiefase wordt een respons van ongeveer 5 log FE bekomen. Daarna begint de biofilmvorming, waardoor de waarden na 24 uur oplopen tot respectievelijk ongeveer 6 en 5.3 log FE voor BHIS en BHI. De log fluorescentierespons van de cellen geïncubeerd in FW blijft na 24 uur op ongeveer 5.



Figuur 3.10. Log fluorescentie van de met SYTO[®] 9 gekleurde *S. mutans* biofilms, gekweekt in het statisch systeem, in functie van de incubatietijd in respectievelijk BHIS, BHI en FW

Fig. 3.11. illustreert hoe het log aantal cellen in de biofilms toe- of afneemt in functie van de incubatietijd in respectievelijk BHIS, BHI en FW. Na adhesie worden ongeveer $10^{7.2}$ cellen per schijfje bekomen. Het log aantal cellen in FW neemt af in functie van de tijd en na 24 uur worden bijna geen levende cellen (10^2 cellen/ schijfje) op het HAP-schijfje meer teruggevonden. Daarnaast blijft de biomassa van de biofilms gegroeid in BHI nagenoeg constant, n.l. $10^{7.3}$ cellen per schijfje na 24 uur. In BHIS echter wordt een toename in biomassa in functie van de tijd opgemerkt, tot ongeveer $10^{8.1}$ cellen per schijfje na 24 uur.

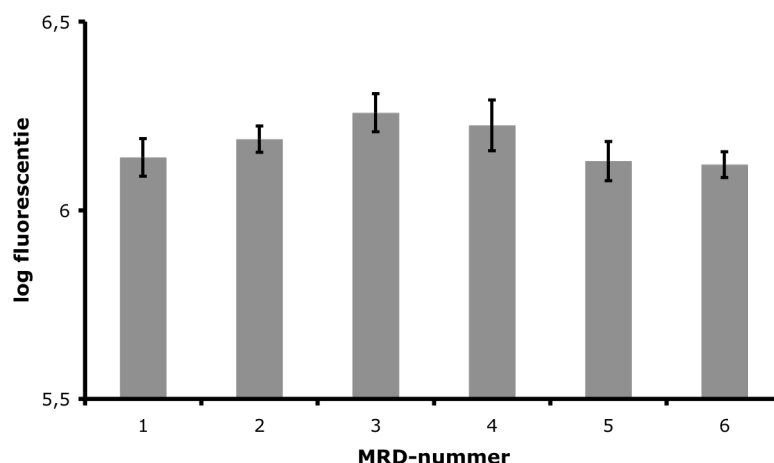


Figuur 3.11. Log aantal cellen in de *S. mutans* biofilms, gekweekt in het statisch systeem, in functie van de incubatietijd in respectievelijk BHIS, BHI en FW

3.2.3.2. De MRDs

3.2.3.2.1. *Variatie tussen de toestellen*

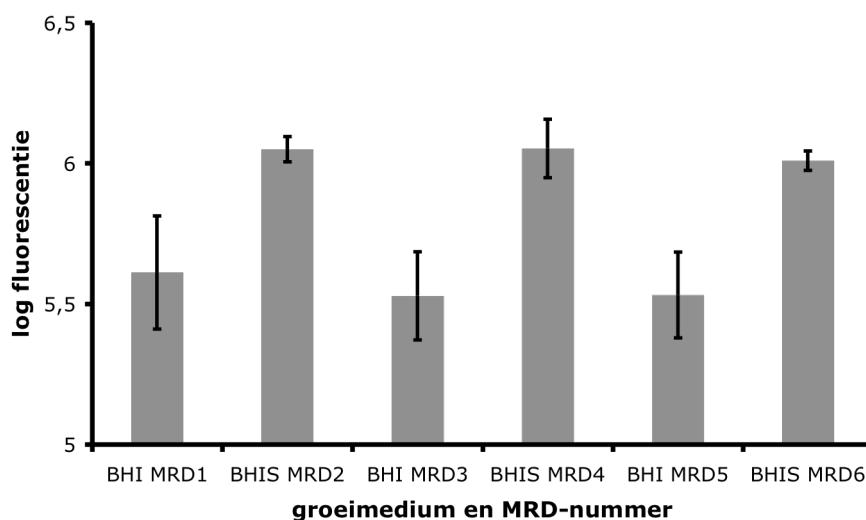
Figuur 3.12 suggereert een trend waarbij de fluorescentierespons van de met SYTO[®] 9 gemerkte *S. mutans* biofilms afhankelijk is van het toestelnummer. Een One-Way ANOVA op deze resultaten toont aan dat er significante ($P < 0.01$) verschillen zijn tussen de waarden bekomen in de verschillende toestellen. Een “overall” gemiddelde log fluorescentierespons van 6.18 ± 0.07 over de 6 toestellen wordt bekomen.



Figuur 3.12. Log fluorescentie \pm SD van de met SYTO[®] 9 gemerkte *S. mutans* biofilms, gegroeid in BHIS in het MRD systeem, in functie van het MRD-nummer (n=6)

3.2.3.2.2. Invloed van sucrose op de biofilmgroei

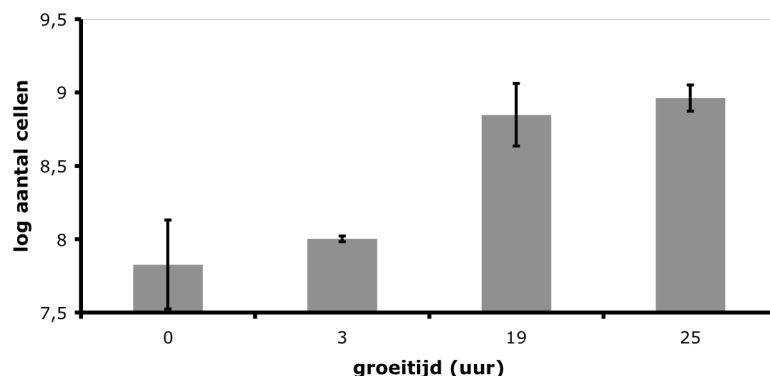
Tussen biofilms gegroeid in BHI en BHIS kan duidelijk een verschil in fluorescentierespons worden opgemerkt (Fig. 3.13.). Een UNIANOVA met als factoren “MRD-nummer” en “groeimedium” wijst op een significant ($P < 0.01$) verschil tussen de respons (log fluorescentie) in respectievelijk BHI (5.6 ± 0.2) en BHIS (6.0 ± 0.1). Het MRD-nummer heeft hier geen significante invloed op de respons.



Figuur 3.13. Log fluorescentierespons \pm SD van de met SYTO[®] 9 gemerkte *S. mutans* biofilms, gegroeid in het MRD systeem, in functie van het groeimedium en het MRD-nummer (n=6)

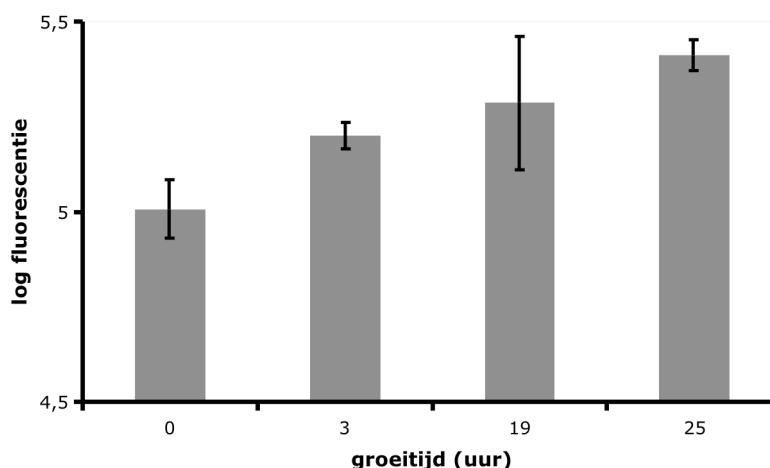
3.2.3.3. De CDC biofilmreactor

Uit Fig. 3.14. kan worden opgemaakt dat het log aantal cellen in de *S. mutans* biofilms toeneemt in functie van de groeitijd in de CDC biofilmreactor. Na de adhesiefase worden ongeveer $10^{7.7}$ cellen per schijfje teruggevonden. Na 25 uur groei wordt een biomassa van ongeveer 10^9 cellen per schijfje bereikt.



Figuur 3.14. Log aantal cellen \pm SD in de *S. mutans* biofilms per schijfje, gegroeid in de CDC reactor, in functie van de groeitijd (n=3)

Ook de log fluorescentierespons van de *S. mutans* biofilms stijgt in functie van de groeitijd in de CDC reactor (Fig. 3.15.). Na de adhesiefase en 25 uur groei wordt een log fluorescentie van respectievelijk $\pm 10^5$ en $10^{5.5}$ per schijfje bekomen.



Figuur 3.15. Log fluorescentie \pm SD van de met SYTO[®] 9 gemerkte *S. mutans* biofilms, gegroeid in de CDC reactor, in functie van de groeitijd (n=3)

3.2.4. Bespreking

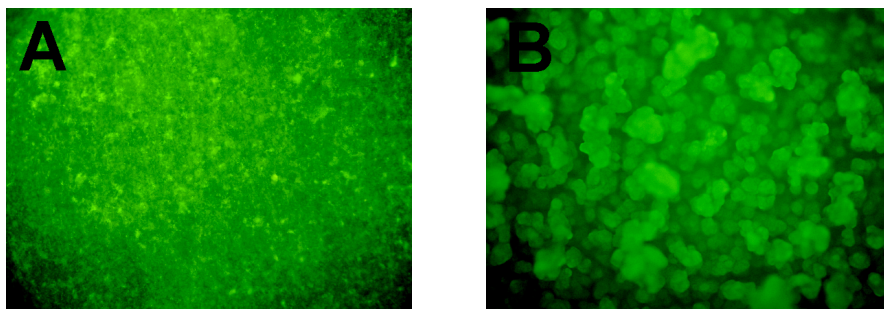
3.2.4.1. Het statisch systeem

Uit de experimenten met het kunstmatig speeksel kan worden besloten dat een conditioneringlaag geen noemenswaardig effect heeft op de biofilmvorming. Dit is in tegenspraak met wat Larsen en Fiehn (1995) rapporteerden over *S. sanguinis* biofilms gekweekt in de MRDs op polysiloxaan. De resultaten bekomen met de verdunde inocula tonen aan dat, wanneer de schijfjes met te weinig cellen worden geïnoculeerd, er geen biofilmvorming optreedt onder de omstandigheden van de test. Met een inoculum van

meer dan 10^4 cellen/ml wordt wel een biofilm bekomen, die toeneemt in biomassa met toenemende celdensiteit van het inoculum. De maximale biofilmvorming wordt bekomen met een inoculum van ongeveer 10^7 cellen/ml of meer. De *S. mutans* biofilms in een statisch systeem blijken, na de adhesiefase, in functie van de tijd vrij snel in biomassa toe te nemen. Deze toename is echter gelimiteerd, hoogst waarschijnlijk omdat de biofilmcellen niet voortdurend aan vers groeimedium worden blootgesteld. Ghigo et al. (2003) beweren dat, omwille van deze reden, statische systemen minder geschikt zijn om biofilms te kweken. De experimenten met de verschillende media (FW, BHI, BHIS) tonen duidelijk aan dat het medium een grote invloed heeft op de biofilmontwikkeling. In FW blijken cellen door het tekort aan nutriënten vrij snel af te sterven. Fluorescentiemetingen wijzen er echter op dat de (dode) cellen wel op het oppervlak geadheerd blijven. Sucrose blijkt een positieve invloed te hebben op de biofilmontwikkeling.

3.2.4.2. De MRDs

De resultaten van de eerste run met de MRDs, met 6 maal BHIS als groeimedium, tonen aan dat de biofilmontwikkeling tussen de verschillende MRD-toestellen varieert (cfr. Fig. 3.12.). Nochtans wordt deze variatie niet teruggevonden in de tweede run, met BHI en BHIS als groeimedium (cfr. Fig. 3.13.). De aanwezigheid van sucrose in het groeimedium blijkt, zoals ook opgemerkt in het statisch systeem, een positieve invloed te hebben op de biofilmontwikkeling, wat ook gerapporteerd werd door Larsen en Fiehn (1995). Het aantal cellen in en de fluorescentierespons van de biofilms gegroeid in aanwezigheid van sucrose liggen duidelijk hoger dan die van biofilms gegroeid in het medium zonder sucrose (Fig. 3.16.). Het is algemeen bekend dat GTF in afwezigheid van sucrose geen dextraan kan vormen (Cury et al., 2000), wat maakt dat BHI in feite biofilms oplevert waarin het GTF inactief is.



Figuur 3.16. Epifluorescentie-microscopische opnamen van *S. mutans* biofilms op HAP-schijfjes gegroeid in (A) BHI en (B) BHIS na kleuring met SYTO[®] 9, objectief 10X

3.2.4.3. De CDC biofilmreactor

De ontwikkeling in de CDC reactor van *S. mutans* biofilms op polysiloxaan kan goed worden gevolgd met behulp van uitplating, maar ook met het SYTO[®] 9-assay. Met de CDC reactor worden, in vergelijking met het statisch systeem, na 24 u groeifase biofilms met een hoger aantal cellen (10^9) bekomen. Het verschil in oppervlak waarop de biofilms worden gegroeid is een mogelijke verklaring hiervoor (zie Algemene inleiding, 2.3.1.). De reden voor de lagere fluorescentie is niet duidelijk.

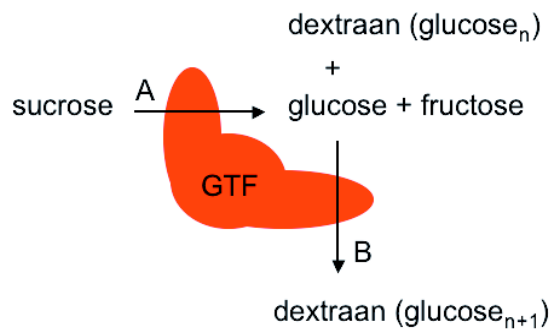
3.2.5. Besluit

Zowel de MRDs als de CDC biofilmreactor hebben bewezen geschikte in vitro systemen te zijn voor de biofilmgroei van *S. mutans* op HAP- of siliconenschijfjes. De MRDs lenen zich uitstekend voor het testen van verschillende preventieve strategieën in parallel (Larsen en Fiehn, 1995), terwijl de CDC biofilmreactor meer voor de studie van de biofilmgroei in functie van de tijd is aangewezen.

4. GTF-INHIBITIE ASSAYS

4.1. PRINCIPE

De reactie, gekatalyseerd door GTFn, kan in twee delen worden opgesplitst. Ten eerste wordt sucrose gesplitst in glucose en fructose. Ten tweede wordt het afgesplitst glucose op een dextraanketen overgedragen (Fig. 4.1.).



Figuur 4.1. Schematische voorstelling van de reacties gekatalyseerd door GTFn: (A) de splitsing van sucrose in glucose en fructose, (B) de overdracht van glucose op dextraan

De twee hierboven beschreven reacties kunnen met behulp van twee assays worden gevolgd. Vooreerst kan de splitsing van een chromogeen sucrose-analoog (p-nitrofenyl-alfa-D-glucopyranoside = PNPG) worden aangetoond door de vrijstelling van p-nitrofenol, dat een gele kleur heeft, te meten. De absorptie is dan een maat voor de "sucrose"-splitsing. Daarnaast kan de vorming van het eindproduct, n.l. onoplosbaar dextraan, gevolgd worden door de turbiditeit te meten in functie van de tijd.

4.2. MATERIALEN EN METHODEN

4.2.1. De GTF-inhibitoren

Als GTF-inhibitoren worden in deze experimenten oplossingen van groene thee (GT; Oystershell N.V., Drongen), Tris (Sigma) en 1-deoxynojirimycine (DJM; Sigma) gebruikt (Devulapalle en Mooser, 1994; Wunder en Bowen, 1999). De oplossingen worden bereid in 10 mM acetaatbuffer, pH 5.5 en 300 mM acetaatbuffer, pH 5.5 voor respectievelijk het PNPG-assay en het dextraanassay.

Eerst wordt per assay de invloed van 1 en 2% GT, 10 en 100 mM Tris en 10 mM DJM op de werking van GTF in drievoud nagegaan. Daarna wordt een experiment uitgevoerd met een verdunningsreeks van GT, waarbij een stockoplossing van 2.5% GT 3 maal sequentieel 1:2 wordt verdund in de respectievelijke media.

4.2.2. GTF

Als enzym wordt het dextraansucrase van *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma), dat sterk gelijkt op het GTF van de streptococci (Wright et al., 2002; Monchois et al., 1998), gebruikt. Het wordt opgelost in MilliQ water (50 units/ml) en verdeeld in “aliquots” van 100 µl over 20 eppendorfbuisjes, die ingevroren worden bij -20° C. Voor elk experiment wordt telkens een nieuwe oplossing ontdooid.

4.2.3. Het PNPG-assay

PNPG (Sigma) wordt opgelost in DMSO (30 mM), waarna deze stockoplossing 1:10 wordt verdund in acetaatbuffer (10 mM, pH 5.5). Per geteste stof worden twee kuipjes van een weefselcultuur microtiterplaat met 96 kuipjes gevuld met 100 µl van deze PNPG-werkoplossing. Aan beide kuipjes wordt vervolgens 90 µl van de te testen stof toegevoegd. Finaal wordt in één van de kuipjes 5 µl GTF-oplossing en in het andere 5 µl MilliQ water, als negatieve controle, gebracht. De microtiterplaat wordt vervolgens 3 uur bij 30° C op een schudplaat geïncubeerd. Na de incubatie wordt de reactie gestopt door toevoeging van 5 µl natriumcarbonaatoplossing (200 mM), wat tevens de gele kleur van het p-nitrofenol versterkt (Stubbs et al., 1999). In ieder experiment worden ook drie kuipjes met GTF en de PNPG-werkoplossing zonder de te testen stof, maar met 90 µl buffer, als positieve controle, meegenomen. De absorpties worden gemeten bij 405 ± 10 nm met behulp van een microtiterplaatlezer. De netto absorpties, bekomen door de absorptie van de negatieve controle van de bruto absorptie af te trekken, worden betrokken op de gemiddelde netto absorptie van de positieve controle, wat relatieve absorpties (in %) oplevert.

4.2.4. Het dextraanassay

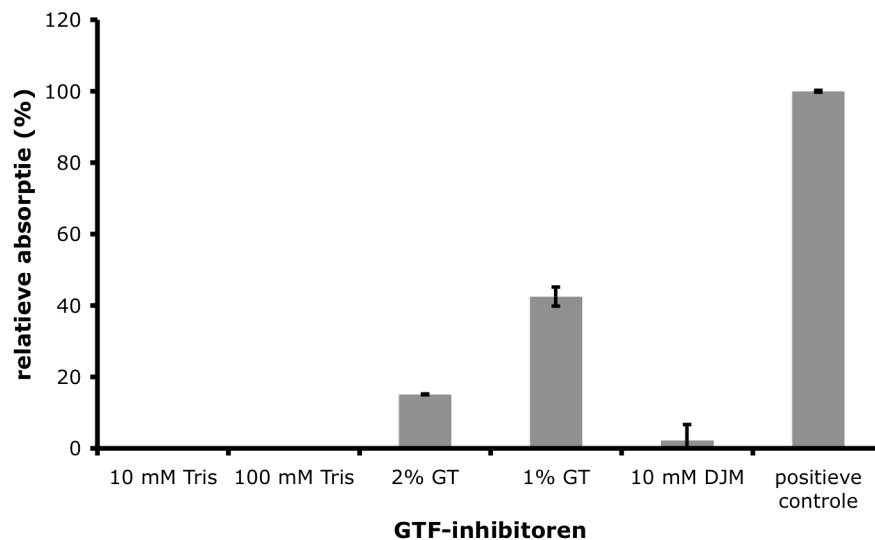
Per geteste stof worden twee kuipjes van een weefselcultuur microtiterplaat met 96 kuipjes gevuld met 100 µl sucrose-oplossing (10% sucrose in 300 mM acetaatbuffer, pH 5.5) (naar Otake et al., 1991). Aan beide kuipjes wordt vervolgens 90 µl van de te testen stof toegevoegd. Finaal wordt in één van de kuipjes 10 µl GTF-oplossing en in het andere 10 µl MilliQ water, als negatieve controle, gebracht. De turbiditeit wordt onmiddellijk gemeten bij 690 ± 10 nm met de microtiterplaatlezer, waarna het plaatje bij 30°C op een schudplaat wordt geïncubeerd. Metingen worden herhaald op geregelde tijdstippen en na 100 min wordt het experiment gestopt. In ieder experiment worden ook drie kuipjes met GTF en sucrose-oplossing zonder de te testen stof, maar met buffer, als positieve controle

meegenomen. De absorpties van de negatieve controles worden van de bruto absorpties van de kuipjes met GTF afgetrokken. Dit levert de netto absorptie van het gevormde onoplosbaar dextraan op.

4.3. RESULTATEN

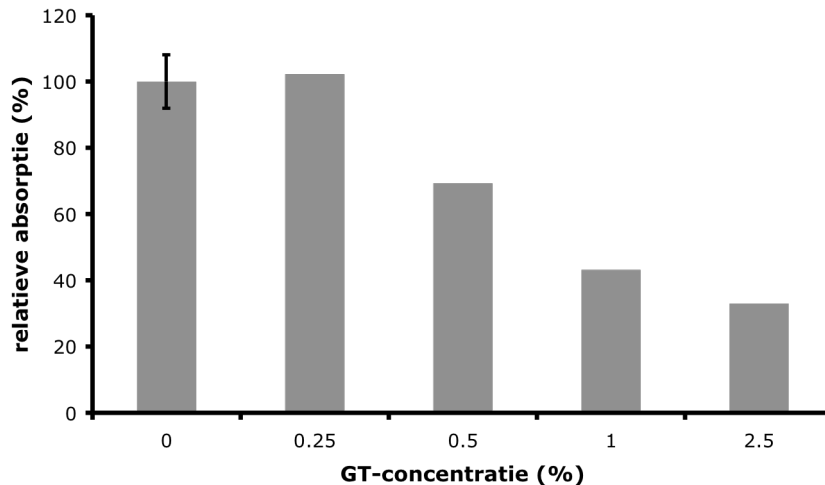
4.3.1. Het PNPG-assay

In Fig. 4.2 wordt de relatieve absorptie (% t.o.v. de positieve controle), bekomen in het PNPG-assay, uitgezet voor de 3 GTF-inhibitoren in verschillende concentraties. Alle inhibitoren leveren bij de verschillende concentraties een daling in PNPG-splitsing op. Beide Tris-oplossingen geven een totale inhibitie van de splitsing, terwijl GT bij zowel 1 als 2% dat niet doet. Het DJM inhibeert nagenoeg compleet de PNPG-splitsing.



Figuur 4.2. Relatieve absorptie (% t.o.v. de positieve controle) \pm SD van het door GTF vrijgestelde p-nitrofenol, in het PNPG-assay, in functie van de gebruikte GTF-inhibitoren in verschillende concentraties (n=3)

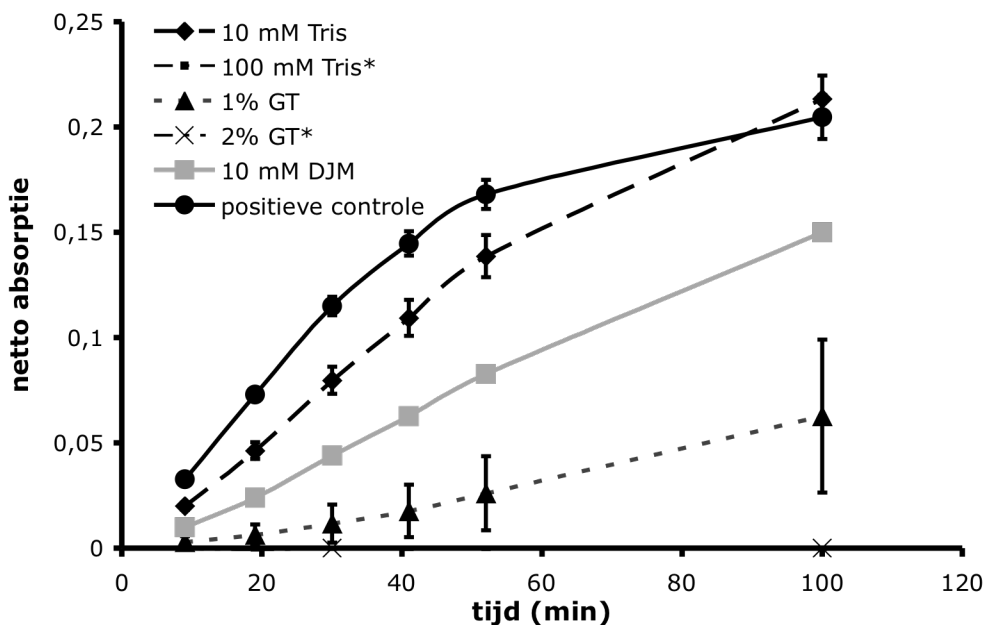
Het effect van de concentratie aan GT op de relatieve absorptie wordt in Fig. 4.3. weergegeven. Hieruit kan worden opgemaakt dat, naarmate de concentratie aan GT stijgt, de relatieve absorptie daalt.



Figuur 4.3. Relatieve absorptie (% t.o.v. de positieve controle) van het door GTF vrijgestelde p-nitrofenol, in het PNPG-assay, in functie van de concentratie aan GT (voor GT 0% is n=3)

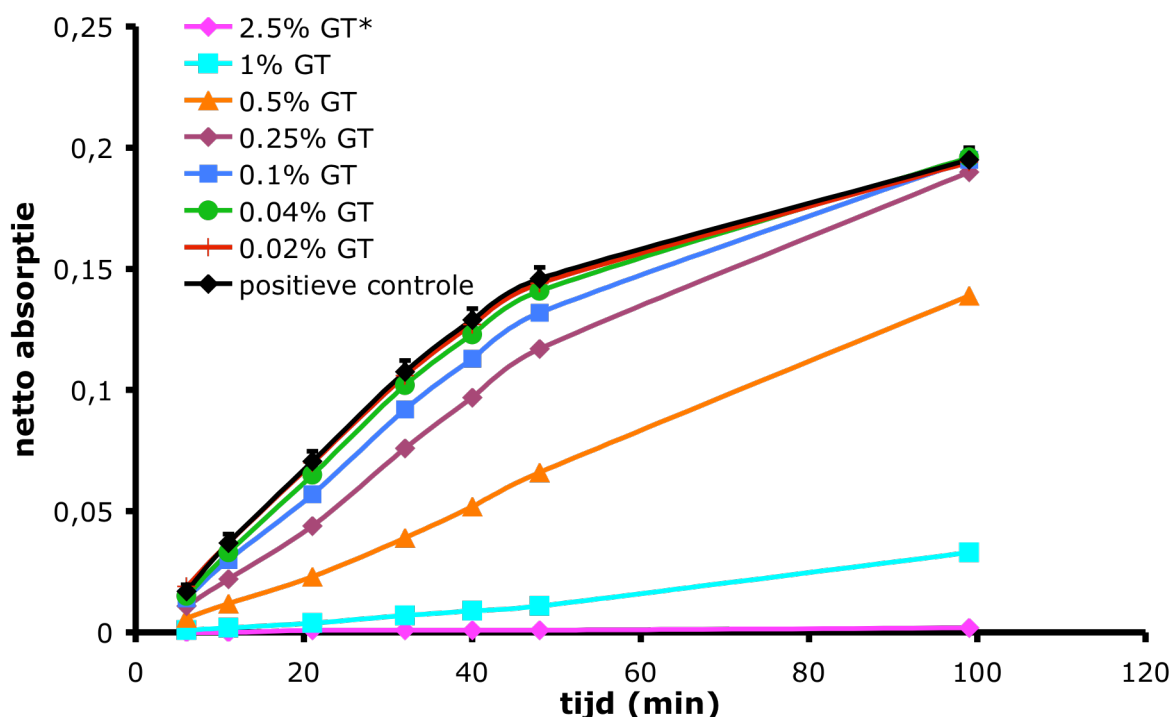
4.3.2. Het dextraanassay

Fig. 4.4. stelt de netto absorptie voor van het gevormde dextraan in functie van de tijd in het dextraanassay voor de 3 GTF-inhibitoren in verschillende concentraties. Alle inhibitoren geven duidelijk een minder snelle stijging in absorptie dan de positieve controle. Het verschil in helling wordt groter bij toenemende concentraties aan Tris en GT. Er wordt geen netto absorptie meer bekomen voor 100 mM Tris en 2% GT.



Figuur 4.4. Netto absorptie \pm SD van het door GTF gevormde dextraan in functie van de tijd in aanwezigheid van 3 GTF-inhibitoren in verschillende concentraties (n=3) (*= curven vallen samen met de X-as)

Fig. 4.5. illustreert de netto absorptie van het gevormde dextraan in functie van de tijd voor verschillende GT concentraties. Hieruit blijkt dat concentraties aan GT lager dan 0.25% geen verandering in helling van de absorptie-tijdcurven (t.o.v. de positieve controle) geven. Bij een concentratie van 2.5 % GT blijft de netto absorptie nul, wat ook al in Fig. 4.4. tot uiting kwam.



Figuur 4.5. Netto absorptie van het door GTF gevormd dextraan in functie van de tijd bij verschillende concentraties aan GT (bij GT 0% is n=3) (* = curve valt samen met de X-as)

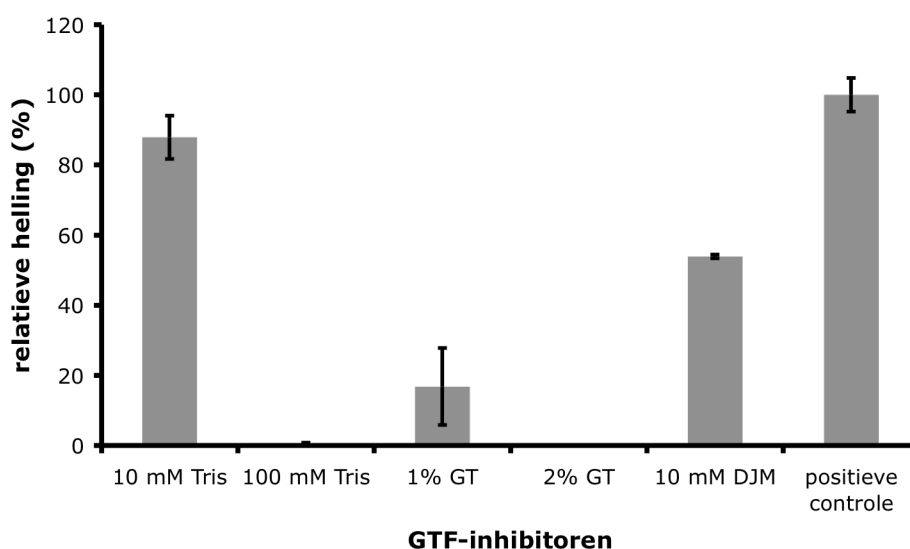
4.4. BESPREKING

4.4.1. Het PNPG-assay

Tris en DJM inhiberen volledig de splitsing van PNPG, wat in overeenstemming is met wat Wright et al. (2002) aantoonen met een assay gebaseerd op de incorporatie van radioactief glucose in dextraan. GT daarentegen levert geen volledige inhibitie van de splitsing van PNPG op, hoewel er wel een concentratie-afhankelijke daling wordt opgemerkt. Het PNPG-assay is een eenvoudig assay, maar dekt niet de twee reactiestappen in de vorming van dextraan, gekatalyseerd door GTFn.

4.4.2. Het dextraanassay

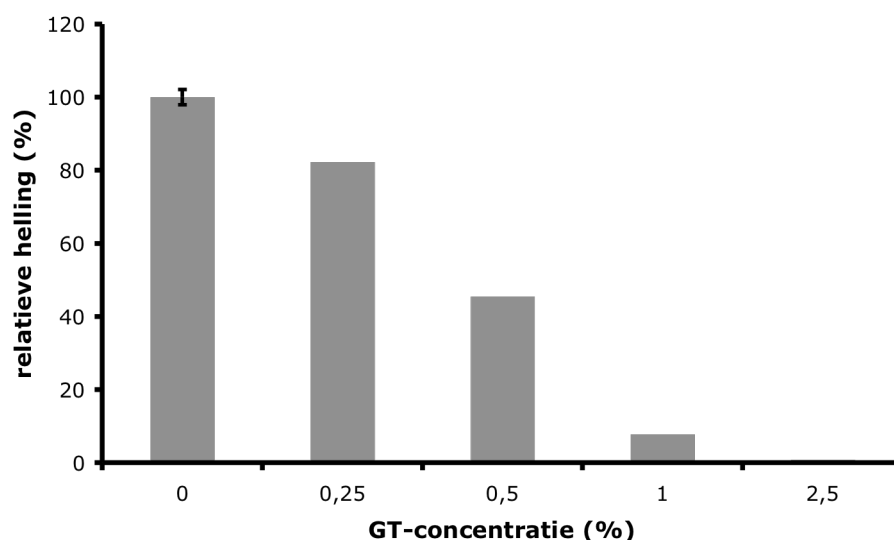
Aangezien de hellingen van de absorptie-tijdcurven van de GTF-inhibitoren in Fig. 4.4. als een maat voor de snelheid van dextraanvorming kunnen worden geïnterpreteerd (of als maat voor de activiteit van het GTF), is het zinvol om ze relatief ten opzichte van de helling van de positieve controlecurve (assay zonder inhibitor) uit te zetten (Fig. 4.6). Deze figuur toont aan dat, in tegenstelling tot het effect in het PNPG-assay, Tris aan 10 mM de reactie niet volledig inhibeert. Ook de inhibitie door DJM is minder uitgesproken in het dextraanassay. Een mogelijke verklaring voor dit verschil in inhibitie is het verschil in substraatconcentratie (PNPG of sucrose) tussen de twee assays, n.l. 0.9% in het PNPG-assay en 10% in het dextraanassay. Tris is een competitieve inhibitor van het GTF (Wright et al., 2002; Devulapalle en Mooser, 1994), zodat de mate van Tris-gerelateerde inhibitie gecorreleerd is met de substraatconcentratie. DJM is een structuuranaloog van de transitietoestand van het glucose tijdens de GTF-gekatalyzeerde reactie (Wright et al., 2002; Devulapalle en Mooser, 1994), waardoor ook hier de mate van inhibitie afhankelijk kan zijn van de substraatconcentratie. Ook de concentraties aan enzym verschillen tussen de twee assays. Er is minder GTF aanwezig in het PNPG-assay dan in het dextraanassay, wat op dezelfde manier als hierboven beschreven de discrepantie tussen de mate van inhibitie van Tris en DJM in de PNPG- en dextraanassays kan verklaren.



Figuur 4.6. Relatieve helling (% t.o.v. de positieve controle) \pm SD van de absorptie-tijdcurven bekomen met het dextraanassay voor 3 GTF-inhibitoren in verschillende concentraties (n=3)

In tegenstelling tot Tris en DJM remt GT in een concentratie van 2% het GTF in het dextraanassay wel volledig, terwijl dit in het PNPG-assay niet het geval is. Waarschijnlijk werkt GT, naast de inhibitie van de splitsing van sucrose, op nog een andere activiteit van het GTF in, waardoor in het dextraanassay, dat, in tegenstelling tot het PNPG-assay, de totale reactie beslaat, een volledige inhibitie wordt bekomen. Wright et al. (2002) suggereren dat natuurproducten de globale fysico-chemische eigenschappen van het enzym beïnvloeden, terwijl Tris en DJM enkel op de actieve plaats van het GTF aangrijpen. Daarenboven rapporteren Meulenbeld en Hartmans (2000) de transglycosylatie van catechinen in PE. Deze catechinen kunnen, door captatie van het glucose, als het ware als competitieve inhibitoren van de glucose-binding op de dextraan-acceptor, in de “tweede” reactiestap van de GTF-katalyse, optreden (zie Fig. 4.1.B.).

Ook de hellingen van de curven van Fig. 4.5. kunnen relatief (% t.o.v. de helling van de positieve controle = 0% GT) worden uitgezet in functie van de GT-concentratie (Fig. 4.7.). De dextraanvorming daalt in functie van de GT-concentratie en een nagenoeg volledige inhibitie van het GTF wordt bereikt bij een concentratie van 1% GT. Dit is opnieuw niet in overeenstemming met het resultaat van het PNPG-assay en kan wellicht op dezelfde manier als hierboven worden verklaard.



Figuur 4.7. Relatieve helling (% t.o.v. de positieve controle) van de absorptie-tijdcurven bekomen met het dextraanassay in functie van de GT-concentratie (bij GT 0% is n=3)

5. REMMING VAN DE *S. MUTANS* BIOFILMVORMING DOOR PE

5.1. PRINCIPES

Aangezien de antibacteriële aanpak voor de bestrijding van tandplak niet afdoende is, wordt gezocht naar alternatieven om de biofilmvorming door *S. mutans* tegen te gaan. De inhibitie van GTF, het sleutelenzym in tandplakvorming, lijkt hiervoor een goede strategie. Van diverse natuurproducten zijn reeds de inhibitie van GTF en de remming van de adhesie van orale commensalen beschreven.

In dit werk worden 44 PE geselecteerd op basis van hun gekende of veronderstelde inhibitie van het GTF. Een taxonomische verwantschap met planten waarvan de GTF-inhibitie gekend is, kan een gelijkaardige activiteit in de verwante plant doen vermoeden. Deze PE worden getest op hun vermogen om in vitro biofilmvorming door *S. mutans* op HAP, in een sub-MIC concentratie, te remmen. Extracten met een duidelijk antibiofilm effect zouden potentiële therapeutica/profylactica voor tandplak kunnen zijn.

De experimenten verlopen als volgt. Eerst wordt het antibacterieel effect van de PE geëvalueerd. Daarna wordt de microbiële contaminatie van de PE gecontroleerd om het risico op interferentie met de biofilmgroei in te schatten. Ten derde worden *S. mutans* biofilms in de MRDs gegroeid in aanwezigheid van sucrose en aan- of afwezigheid van een PE, in een sub-MIC concentratie. De biomassa van de gegroeide biofilms wordt gekwantificeerd met behulp van het SYTO[®] 9-assay. Tenslotte wordt de mogelijke inhibitie van de GTF-gemedieerde dextraanvorming door de PE, ter verklaring van het antibiofilmeffect van de geselecteerde PE, nagegaan.

5.2. MATERIALEN EN METHODEN

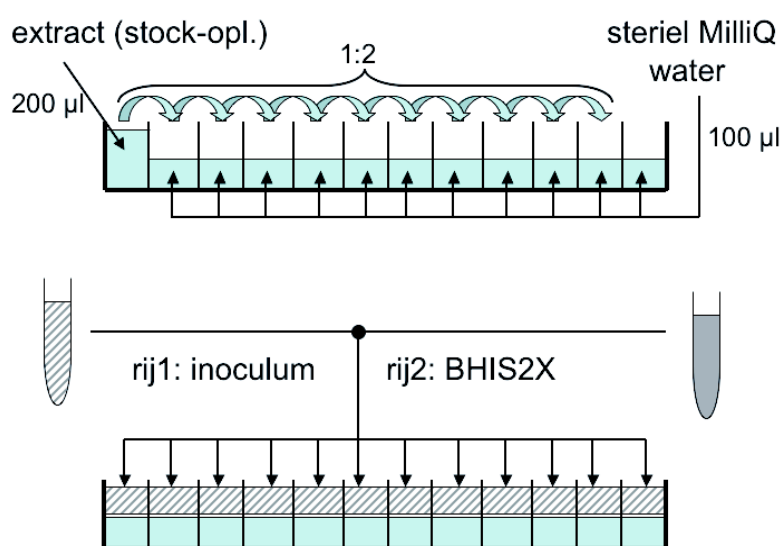
5.2.1. De plantenextracten

Alle PE zijn 50 % alcoholische extracten (Oystershell NV) en worden bewaard bij 4°C in het donker. Aangezien de namen van de extracten confidentieel zijn, wordt aan alle PE een code toegekend, E1 – E51. In het totaal worden in deze studie 44 PE getest met daarvan E20 en E51 respectievelijk een epigallocatechin-gallaat (EGCG)-geconcentreerd en een niet-geconcentreerd GT extract.

5.2.2. Antibacterieel effect van de PE

Van een overnachtcultuur van *S. mutans* LMG 14558^T in 10 ml BHI worden de cellen geoogst door middel van centrifugatie (4 min, 4000 rpm). De “pellet” wordt gehersuspendeerd in 6 ml dubbel geconcentreerd BHI, gesupplementeerd met 2% sucrose (BHIS2X). De OD van de celsuspensie bij 660 nm wordt op 1 gebracht, wat overeenkomt met ongeveer 10^7 cellen/ml. Tenslotte wordt het inoculum bekomen door deze suspensie 1:5 te verdunnen in BHIS2X.

De PE worden 1:10 verdund in steriel MilliQ water om de alcoholfractie tot een niet-antibacteriële concentratie te verlagen (= stockoplossing). Van elke stockoplossing wordt tweemaal 200 µl in het eerste kuipje van een rij in een weefselcultuur microtiterplaat met 96 kuipjes gebracht. In de andere kuipjes van deze rijen wordt 100 µl steriel MilliQ water gepipetteerd. Vervolgens wordt, uitgaande van de eerste kuipjes in iedere rij, 10 maal sequentieel 1:2 verdund in het steriel MilliQ water met behulp van een multichannelpipettor (Fig. 5.1.). Op deze manier worden er per extract twee verdunningsreeksen gemaakt (2 rijen van de microtiterplaat). Het laatste kuipje van de rij bevat 100 µl steriel MilliQ water.



Figuur 5.1. Schematische voorstelling van het vullen van de microtiterplaten en het maken van de verdunningsreeksen voor het nagaan van de antibacteriële werking van de PE

Tenslotte wordt aan de 12 kuipjes van één rij per extract 100 µl inoculum toegevoegd. Aan de tweede rij van hetzelfde extract wordt 100 µl BHIS2X als controle toegevoegd. Na 24 uur incubatie bij 37°C wordt de absorptie van de kuipjes bij 690 ± 10 nm gemeten met een microtiterplaatlezer. De absorpties van de controles worden van de absorpties van de geïnoculeerde kuipjes afgetrokken, wat netto absorpties oplevert.

5.2.3. Controle van de microbiële contaminatie van de PE

Preliminair experimenten hebben aangetoond dat de extracten niet via filtratie kunnen worden gesteriliseerd, omdat de filters zeer snel verstopt raken. Aangezien de extracten hittegevoelige actieve bestanddelen kunnen bevatten, wordt geadviseerd om ze ook niet via autoclaving te steriliseren. Ter controle van hun graad van microbiële contaminatie worden de extracten uitgeplaat. De eventueel aanwezige bacteriën en fungi zouden kunnen interfereren met de groei van de *S. mutans* biofilms (zie verder).

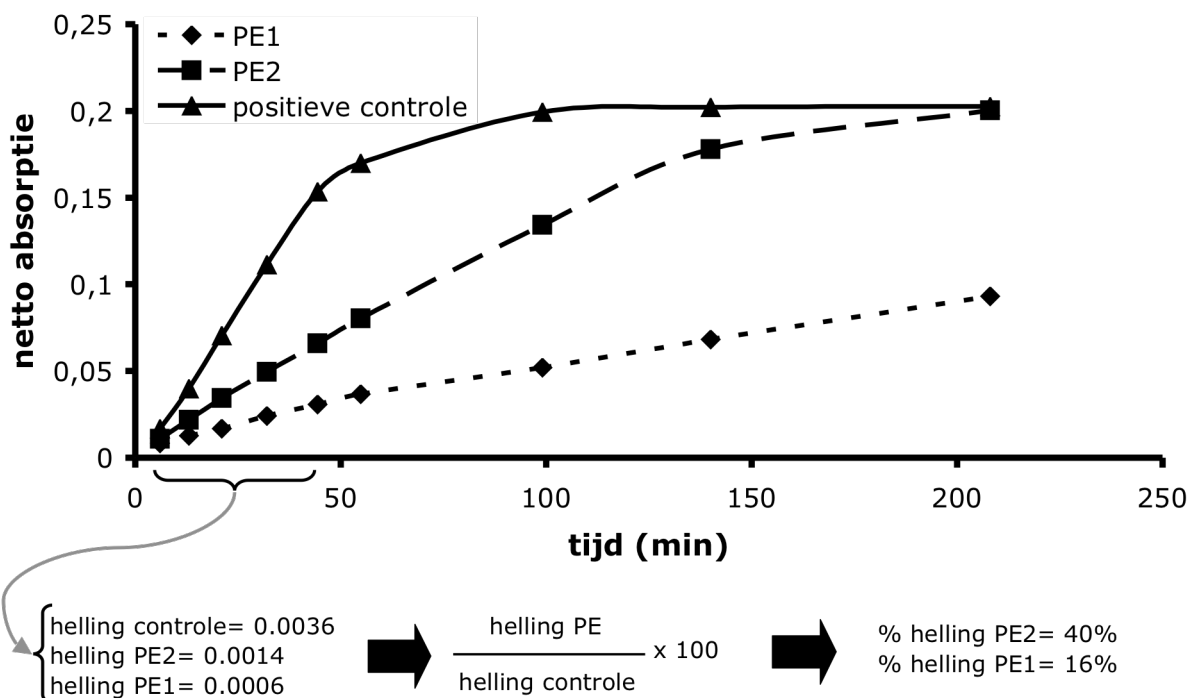
Om het hoge alcoholgehalte, dat een groei-inhibitie kan geven, te reduceren, wordt elk extract verdund in steriel MilliQ water (1:10). Vervolgens wordt elk verdund extract verder 5 maal opeenvolgend 1:10 verdund in BHI. Van elk buisje wordt 1 ml uitgeplaat op BHIA, waarna de platen en de buisjes samen gedurende 48 uur bij 37°C worden geïncubeerd. Na de incubatie worden de kolonies op de platen geteld en wordt nagegaan in welke buisjes troebeling (groei) te zien is.

5.2.4. Evaluatie van de remming van de *S. mutans* biofilmvorming door PE

Voor de groei van *S. mutans* biofilms wordt gebruik gemaakt van een opstelling met 6 MRD toestellen in parallel en HAP-schijfjes (zie 3.2.2.3.). Hier worden als groeimedium steeds 1% oplossingen van het te testen plantenextract in BHIS gebruikt. Daartoe worden de PE aseptisch aan het groeimedium toegevoegd. In alle experimenten wordt, naast 5 flessen met BHIS en een plantenextract, telkens 1 fles met BHIS als controle meegenomen. De biofilm-biomassa's worden gekwantificeerd met behulp van het SYTO[®] 9-assay (zie 3.2.2.5.). Ieder onafhankelijk experiment wordt een "run" genoemd. Alle extracten worden enkel- of meervoudig getest. De relatieve fluorescentie (PE versus controle) wordt berekend door de gemiddelde fluorescentierespons van de PE (afkomstig van de 6 schijfjes in een MRD) te delen door de gemiddelde fluorescentierespons van de controle en te vermenigvuldigen met 100.

5.2.5. Bepaling van de inhibitie van het GTF door de PE

De inhibitie van het GTF door de PE (1% concentratie) wordt nagegaan in het dextraanassay (zie 4.2.4.). De relatieve hellingen (% t.o.v. die van de positieve controle) van de netto absorptie-tijdcurven van de PE, bepaald via het dextraanassay, worden vervolgens berekend, als maat voor de resterende activiteit van het GTF. In Fig. 5.2. wordt deze berekening voor twee (fictieve) PE geïllustreerd. De standaarddeviaties worden op de geschatte hellingen berekend.



Figuur 5.2. Schematische voorstelling van de berekening van de relatieve helling (% t.o.v. die van de positieve controle) van de netto absorptie-tijdcurven voor de PE uit de gegevens van het dextraanassay

5.2.6. Statistische evaluatie

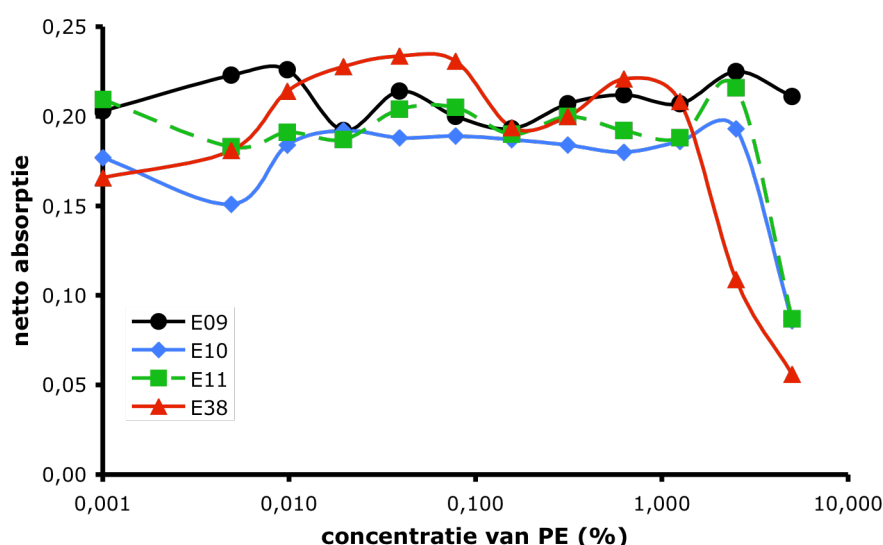
Aangezien er variatie kan optreden tussen de verschillende MRDs in het biofilmsysteem, moet daarmee rekening worden gehouden in de interpretatie van de resultaten. Op alle data verkregen uit de biofilmexperimenten wordt een lineair mixed-effect model (ANOVA) toegepast met behulp van S-plus 6.0 software. Hierbij wordt de fluorescentie van de met SYTO® 9 fluorescent “gekleurde” biofilms als responsvariabele genomen. Het extractnummer wordt als “fixed” factor in het model gebracht. Tenslotte worden de factoren “run” en “MRDnr” als “random” factoren in het model opgenomen. Significante verschillen in fluorescentierespons tussen de PE en de negatieve controle worden dan met behulp van dit model opgespoord.

Om de PE met een significante inhibitie van de GTF-gemedieerde dextraanvorming op te sporen, worden de hellingen van de netto absorptie-tijdcurven voor de PE met die van de controle met behulp van een T-test vergeleken.

5.3. RESULTATEN

5.3.1. Antibacteriële activiteit en microbiële contaminatie van de PE

Geen van de 44 PE vertoont groeiremmende activiteit tegenover *S. mutans* bij een concentratie van 1%. Van enkele PE (E10, E11 en E38) geven hogere concentraties wel aanleiding tot groeiremming (zie Fig. 5.3., E09 is hier als voorbeeld van een PE dat geen groeiremmende activiteit vertoont in opgenomen). Daarenboven bevat geen enkel van de PE detecteerbare aantallen bacteriën/fungi. Na incubatie van de verdunningen is in geen enkele buis troebeling aanwezig en op geen enkele plaat worden kolonies waargenomen.

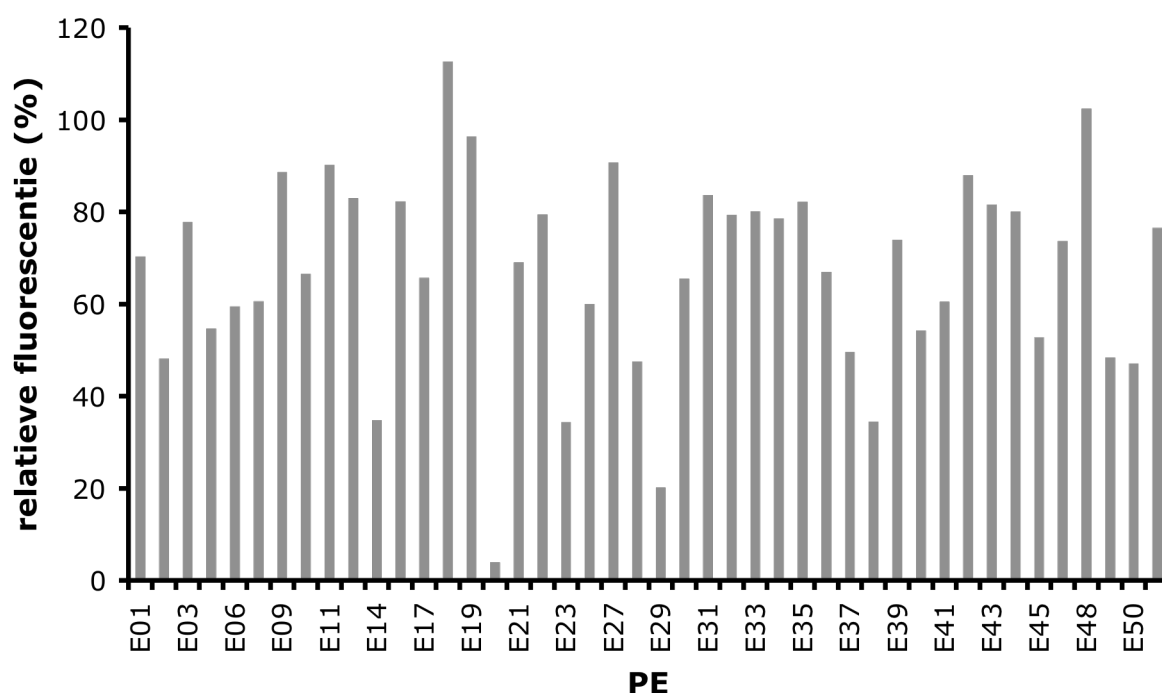


Figuur 5.3. Netto absorptie van de *S. mutans* culturen in functie van de concentratie van de PE in het medium voor E09 (als voorbeeld van een PE dat geen groeiremmende activiteit heeft), E10, E11 en E38 (die als enige wel groeiremmende activiteit vertonen)

5.3.2. Studie van de remming van de *S. mutans* biofilmvorming door PE

De statistische evaluatie wijst uit dat de biofilms gegroeid in aanwezigheid van 12 (E4, E14, E20, E23, E28, E29, E36, E37, E38, E45, E49, E50) van de 44 extracten een significant ($P < 0.05$) lagere fluorescentierespons geven dan de controle (biofilms gegroeid in BHIS). Voor 3 extracten (E2, E39, E40) wordt een trend in die richting opgemerkt ($0.1 < P < 0.05$). In Fig. 5.4 wordt de relatieve fluorescentie van de met SYTO[®] 9 gemerkte *S. mutans* biofilms voor de verschillende PE voorgesteld. Om de grafiek niet té druk te

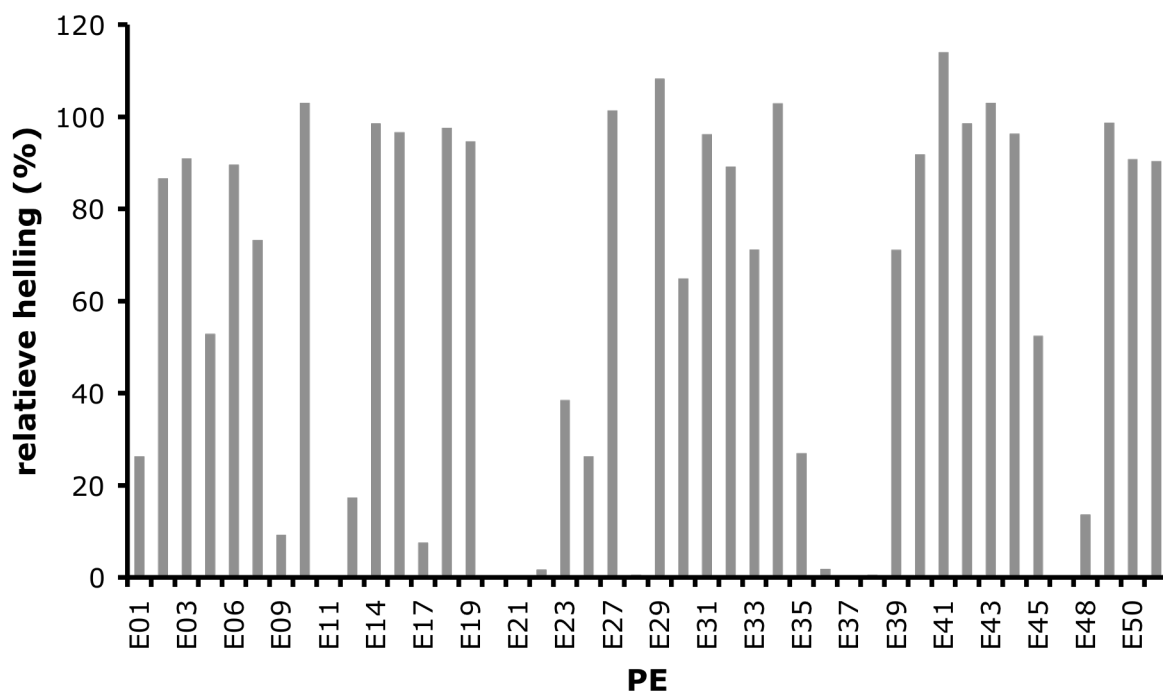
maken, worden de standaarddeviaties niet weergegeven. E20 levert de laagste relatieve fluorescentie op (3.9%).



Figuur 5.4. Relatieve fluorescentie (% t.o.v. de controle) van de met SYTO[®] 9 gemerkte *S. mutans* biofilms gegroeid in de MRDs voor de verschillende PE, toegevoegd aan het groeimedium (1%)

5.3.3. Bepaling van de inhibitie van GTF door de PE

In het dextraanassay vertonen de absorptie-tijdcurven van 13 extracten (E09, E11, E12, E17, E20, E21, E22, E28, E36, E37, E38, E47 en E48) een significant lagere helling dan de helling van de positieve controle. Van deze 13 leveren 2 extracten een relatieve helling van ongeveer 15% op, de andere 11 geven aanleiding tot een relatieve helling lager dan 10%, waarbij de netto absorptie-tijdcurven van E11, E20, E21, E37 en E47 een relatieve helling van 0% vertonen. In Fig. 5.5. worden de relatieve hellingen van netto absorptie-tijdcurven voor de verschillende PE voorgesteld. Ook hier worden de SDs voor de duidelijkheid van de grafiek weggelaten.



Figuur 5.5. Relatieve helling (% t.o.v. de positieve controle) van de netto absorptie-tijdcurven in het dextraanassay voor de verschillende PE

5.4. BESPREKING

Sommige extracten vertonen een groeiremmende werking ten opzichte van *S. mutans*. Dit is te verwachten aangezien heel wat PE gekend zijn voor hun antimicrobiële activiteit (Lai en Roy, 2004; Rios en Recio, 2005). Omdat een antibacterieel effect niet gewenst is, wordt in de biofilmexperimenten gewerkt in een concentratie (1%) die de groei van *S. mutans* niet remt.

Een aantal extracten oefent een duidelijk effect uit op de biofilmvorming door *S. mutans*. Het geconcentreerde GT extract (E20) levert de grootste daling in fluorescentie op, terwijl het niet-geconcentreerde GT extract (E51) geen significante invloed heeft op de biofilmontwikkeling. Naar alle waarschijnlijkheid is de concentratie van de EGCGn, de actieve componenten in GT (Otake et al., 1991), in E51 te laag om een significant antibiofilm effect te geven.

Over het verband tussen GTF-inhibitie en remming van de biofilmvorming door PE is weinig geweten. In een paar studies (Koo et al., 2003; Ito et al., 2003; Otake et al., 1991) werd een effect van GTF-inhiberende PE op tandplakontwikkeling in ratten aangetoond. De meeste “biofilm”-experimenten werden echter in vitro in een statisch systeem

uitgevoerd (Koo et al., 2003; Hashimoto et al., 2001; Wu-Yuan et al., 1990). In andere gevallen werd enkel de invloed van GTF-inhiberende PE op de adhesie van streptococcen nagegaan (Ooshima et al., 2000; Wu-Yuan et al., 1988; Murata et al., 1995; Duarte et al., 2003; Koo et al., 2000; Nakahara et al., 1993; Yanagida et al., 2000). De gebruikte in vitro systemen (statisch systeem en adhesie) in al deze gerapporteerde studies zijn duidelijk minder geschikt voor de voorspelling van de activiteit van PE op de biofilmvorming. Daarenboven wordt slechts zelden met PE in sub-MIC concentraties gewerkt, waardoor het geobserveerde effect op biofilms ook aan een antibacteriële werking, i.p.v. GTF-inhibitie, te wijten zou kunnen zijn. Om een eventueel verband tussen de remming van de biofilmvorming en de inhibitie van de GTF-gemedieerde dextraanvorming door de PE aan het licht te brengen, worden de geteste PE in 4 klassen ingedeeld (Tabel 5.1).

Tabel 5.1. Kruistabel van de PE, ingedeeld op basis van hun remming van de biofilmvorming en de inhibitie van het GTF

		Significante inhibitie van het GTF	
		ja	nee
significante remming van de biofilmvorming	ja	E20, E28, E36, E37 en E38	E4, E14, E23, E29, E45, E49 en E50
	nee	E9, E11, E12, E17, E21, E22, E47 en E48	E1, E2, E3, E6, E7, E10, E11, E15, E18, E19, E24, E27, E30, E31, E32, E33, E34, E35, E39, E40, E41, E42, E43, E44 en E51

Een eerste klasse is die van de 5 PE (waaronder geconcentreerde GT) die in beide assays effecten vertonen. Voor deze PE kan de remming van het GTF een mogelijke verklaring zijn van het effect op de biofilmvorming door *S. mutans*. De tweede klasse bevat de extracten die geen effect vertonen op zowel de biofilmvorming als op de GTF-activiteit. Hoewel de extracten werden geselecteerd op basis van hun vermoede GTF-inhiberende eigenschappen, valt het overgrote deel van de PE in deze klasse. Geen enkel van de extracten werd gestandaardiseerd, zodat het mogelijk is dat de GTF-inhiberende componenten, die in deze PE zouden kunnen vóorkomen, in te lage concentraties aanwezig zijn om in het dextraanassay een significant effect uit te oefenen. Extracten, die de biofilmvorming remmen, maar niet het GTF (de derde klasse), grijpen wellicht op een ander aspect van de biofilmvorming aan. Mogelijke mechanismen zijn de inwerking van

catechinen uit de PE op de membraanfluïditeit van de bacteriën (Tsuchiya, 1999), van polyfenolen uit de PE op de communicatie (QS) tussen de biofilmbacteriën (Huber et al., 2003) of de inhibitie van membraanpompen (Roccaro et al., 2004). Het voorkomen van extracten (de vierde klasse) die GTF inhiberen, maar geen invloed hebben op de biofilmvorming is onverwacht. Een mogelijke verklaring zou hier een verschil in de mate van GTF-inhibitie tussen de PE van klasse 1 en klasse 4 kunnen zijn. Met behulp van het eenvoudige dextraanassay was het niet mogelijk om een dergelijk verschil aan te tonen. Een verdere uitdieping van het fenomeen van de GTF-inhibitie door deze PE (van klasse 1 en 4) zou hierover uitsluitel kunnen geven.

6. BESLUITEN

In het tweede deel van dit proefschrift werden methoden ontwikkeld voor de studie van de inhibitie van de *S. mutans* biofilmvorming op HAP door PE. Tevens werd nagegaan of deze remming te wijten was aan GTF-inhibitie.

Het statisch systeem, de MRDs en de CDC biofilmreactor hebben hun bruikbaarheid bewezen voor de groei van *S. mutans* biofilms. Van deze systemen zijn de MRDs het meest geschikt om de invloed van PE op de biofilmvorming na te gaan. De gekweekte biofilms worden gekwantificeerd met een “surrogaat”-assay op basis van fluorescente “kleuring” met SYTO® 9.

Van de twee ontwikkelde enzymassays is het dextraanassay, dat het eindproduct in functie van de tijd kwantificeert, geschikter om de GTF-inhibitie door PE te volgen dan het PNPG-assay, dat slechts de beginstap in de vorming van dextraan imiteert.

Tenslotte werden de remming van de biofilmontwikkeling en de inhibitie van GTF-gemedieerde dextraanvorming door 44 PE nagegaan. Van deze PE waren er slechts een vijftal die in beide assays een effect vertoonden, terwijl het merendeel noch de GTF-activiteit, noch de biofilmvorming beïnvloedden. De enkele PE die de dextraanvorming niet remmen, maar wel de biofilmontwikkeling verstoren, doen dit wellicht via alternatieve mechanismen (bvb. de inhibitie van QS of de destabilisatie van membranen). Het voorkomen van extracten die het GTF inhiberen en geen effect op de biofilmvorming vertonen, zou kunnen te wijten zijn aan een onvoldoende gevoeligheid (resolutie) van het dextraanassay.

ALGEMENE CONCLUSIES

Dit proefschrift vervulde als het ware een pioniersrol bij het opzetten van biofilmonderzoek in het Laboratorium voor Farmaceutische Microbiologie. Allereerst dienden de “tools” te worden ontwikkeld voor de in vitro groei van gistbiofilms (*C. albicans* op polysiloxaan) en bacteriële biofilms (*S. mutans* op HAP). Zowel de MRDs als de CDC biofilmreactor hebben hun bruikbaarheid voor dit doel bewezen. De MRDs lenen zich uitstekend voor het in parallel testen van verschillende omstandigheden van biofilmgroei, met inbegrip van preventieve strategieën. Met de CDC biofilmreactor kunnen vlot kinetische biofilmstudies worden uitgevoerd.

Een tweede “tool”, die uit dit onderzoek voortkwam, zijn geschikte “surrogaat”-assays, op basis van fluorescente “kleuring” en meting in een microtiterplaatlezer, voor de “high-throughput” kwantificatie van de biofilmbiomassa. Deze assays zijn superieur aan de plaatmethode qua snelheid en accuraatheid (in situ fluorescente “kleuring” versus losmaken van de biofilmcellen).

In derde instantie werd de toepasbaarheid van de ontwikkelde “tools” voor de evaluatie van preventieve strategieën voor de biofilmvorming in vitro onderzocht. De MRDs zijn nuttig voor zowel de studie van gemodificeerde oppervlakken (“vermengde” en geïmpregneerde siliconenschijfjes) als van antibiofilm componenten (bvb. PE), die in het groeimedium worden opgelost. Voor dat laatste doel is de CDC biofilmreactor minder geschikt, omdat grotere hoeveelheden product vereist zijn en slechts één product per run kan worden getest. Gemodificeerde polymeren kunnen hiermee wel simultaan worden bestudeerd, op voorwaarde dat er geen “carry-over” is van stoffen die uit de schijfjes zouden weglekken.

Dit werk heeft reeds aanleiding gegeven tot “follow-up”-onderzoek van het effect van chemisch gemodificeerde oppervlakken op de ontwikkeling van *C. albicans* biofilms, van de genexpressie in *C. albicans* biofilms en van het effect van gefractioneerde PE op de biofilmvorming door *S. mutans*. Het onderzoek in het Laboratorium voor Farmaceutische Microbiologie met betrekking tot de preventie van biofilmvorming is sinds dit proefschrift uitgebreid tot studies van de biofilms van *P. aeruginosa*, *S. aureus* en *Propionibacterium acnes*.

SAMENVATTING – SUMMARY

1. SAMENVATTING

Steeds meer microbiologisch onderzoek wordt toegespitst op biofilms, een verzamelnaam voor sessiele populaties van micro-organismen die vastgehecht zitten op een oppervlak en omgeven zijn door een extracellulaire matrix. Biofilms zijn betrokken bij verschillende persistente humane infecties en vertonen een verhoogde resistentie tegen antimicrobiële stoffen (in vergelijking met planktonische cellen). In dit proefschrift worden twee biofilms, n.l. *C. albicans* biofilms op polysiloxaan en *S. mutans* biofilms op hydroxyapatiet, bestudeerd. Hiervoor werden in eerste instantie modelsystemen ontwikkeld voor de kwantificatie en de in vitro kweek van biofilms. Deze “tools” werden in een tweede fase van het onderzoek aangewend voor de evaluatie van strategieën om de biofilmvorming tegen te gaan.

Eerst werd het voorkomen van *Candida* species op spraakprothesen en hun gevoeligheid aan antimycotica bepaald. *C. albicans* was het overheersend species en vertoonde een uniforme gevoeligheid voor nystatine in een lage concentratie. Orale biofilms kunnen diverse micro-organismen bevatten, waaronder *S. mutans*, die in dit werk als model voor tandplak werd bestudeerd.

Drie in vitro systemen, voor de groei van *C. albicans* en *S. mutans* biofilms, werden vergeleken. Wat het statisch systeem betreft, bestaat er twijfel of hierin wel “echte” mature biofilms worden bekomen of eerder een populatie van geadheerde en geaccumuleerde planktonische cellen. De MRDs zijn uitermate geschikt om biofilms in parallel te groeien onder verschillende omstandigheden en om antibiofilm strategieën te testen. De biofilms met de hoogste celdensiteit werden bekomen in de CDC reactor, die ideaal is om de biofilmontwikkeling kinetisch te volgen.

De gouden standaard voor de kwantificatie van biofilms is de plaatmethode, hoewel het niet steeds zeker is dat biofilmcellen kwantitatief van oppervlakken kunnen worden losgemaakt. In dit proefschrift werden “surrogaat”-assays op basis van de bepaling van een metabole activiteit (het XTT- en FDA-assay) of van de fluorescente “kleuring” van een cellulair element (het SYTO[®] 9-, SYTOX[®] Green- en PI-assay) voor de kwantificatie van zowel planktonische als biofilmcellen geëvalueerd. Voor de kwantificatie van de biomassa van *C. albicans* biofilms was het FDA-assay het meest geschikt. Het XTT-assay, dat in de

literatuur courant wordt aangewend om gistbiomassa te bepalen, scoorde echter minder goed. De fluorescentie na “kleuring” met SYTO[®] 9 was een bruikbare maat voor het aantal *S. mutans*-cellen. De SYTOX[®] Green- en PI-assays waren niet in staat om dode cellen te detecteren in aantallen die nodig zijn om antimicrobiële effecten aan te tonen.

Om potentieel antimycotische siliconen te vervaardigen werd nystatine vóór (“vermengd”) en na (geïmpregneerd) de vulkanisatie in het polysiloxaan opgeladen. HPLC-extracten van beide typen siliconen toonde aan dat significante hoeveelheden nystatine uit het opgeladen polysiloxaan kunnen worden vrijgesteld. Een diskdiffusietest wees uit dat deze vrijstelling gecorreleerd was met het antimycotisch effect van het polysiloxaan. Wanneer *C. albicans* biofilms op “vermengde” schijfjes werden gegroeid, werd enkel in het statisch systeem een gereduceerde biomassa, in vergelijking met niet-opgeladen schijfjes, bekomen. In de MRDs en de CDC reactor werd geen effect van het nystatine op de biofilmvorming vastgesteld, waarschijnlijk omdat de continue stroom van groeimedia het antimycoticum uit het polymeer loogt. Deze bevindingen suggereren een tijdelijk “burst”-effect bij de vrijstelling van het opgeladen nystatine.

S. mutans produceert glucosyltransferasen (GTFn), die de biosynthese van extracellulair dextraan katalyseren. Ter voorkóming van *S. mutans* biofilms, werden plantenextracten (PE) geselecteerd op basis van hun relatie met gekende GTF-inhiberende planten. Teneinde een niet-groeiremmende concentratie te kiezen werd eerst het antibacterieel effect van deze PE op *S. mutans* onderzocht. De microbiële contaminatie van de PE werd nagegaan om hun mogelijke interferentie met de *S. mutans* biofilmontwikkeling in te schatten. *S. mutans* biofilms werden in de MRDs gegroeid in aan- of afwezigheid (= controle) van PE in een sub-MIC-concentratie en de biomassa's, bepaald in het SYTO[®] 9 assay, werden vergeleken. Om de GTF-inhibitie door de PE te onderzoeken, werden twee enzymassays gebruikt, één gesteund op de splitsing van het p-nitrofenyl-alfa-D-glucopyranoside, het andere op de vorming van het dextraan. Op basis van de resultaten van de biofilmexperimenten en het tweede enzymassay, kunnen de PE in 4 klassen worden ingedeeld. De eerste klasse omvat de extracten die zowel de biofilmvorming als het GTF inhiberen, wat een causaal verband tussen beide effecten suggereert. De PE die noch een effect op de biofilmvorming, noch een effect op de werking van het GTF vertonen, vormen de tweede klasse. De derde klasse bestaat uit de extracten die geen invloed hebben op de activiteit van het GTF, maar wel de biofilmontwikkeling tegengaan,

wat waarschijnlijk te wijten is aan een niet-GTF-gerelateerd werkingsmechanisme. De vierde klasse bestaat uit de PE die alleen het GTF inhiberen, maar geen effect hebben op de biofilmontwikkeling. Het gehalte aan GTF-inhiberende componenten in deze extracten is wellicht te laag om een significante antibiofilmactiviteit uit te oefenen.

Samengevat werden in dit proefschrift de “tools” voor de studie van de ontwikkeling en de preventie van een gistbiofilm en een bacteriële biofilm ontwikkeld. Dit werk heeft aanleiding gegeven tot “follow-up” onderzoek met betrekking tot *C. albicans* biofilmvorming op chemisch gemodificeerd polysiloxaan, de genexpressie in *C. albicans* biofilms en het effect van gefractioneerde PE op *S. mutans* biofilms. Recent werd het onderzoek uitgebreid tot biofilms door andere micro-organismen, n.l. *S. aureus*, *P. aeruginosa* en *Propionibacterium acnes*.

2. SUMMARY

The importance and ubiquitous nature of biofilms have become generally recognized in microbiology. These sessile communities of microorganisms imbedded in an extracellular polymeric matrix on a surface are characterized by a high resistance to antimicrobial treatments. Also, their contribution to numerous persistent infections in humans has been well established. In this work, two types of biofilms, i.e. *C. albicans* on silicone and *S. mutans* on hydroxyapatite have been studied. Suitable in vitro systems were developed to grow and quantify these biofilms and were subsequently used to evaluate strategies for the prevention of biofilm formation.

First, the occurrence of *Candida* species on tracheoesophageal voice prostheses and their susceptibility to antimycotics have been investigated. *C. albicans* was the predominant yeast species and the isolates showed a uniform sensitivity to nystatin in low concentration. Oral biofilms are known to harbour a great number of different microorganisms. *S. mutans* biofilms are representative of dental plaque.

Three model systems for in vitro growth of *C. albicans* and *S. mutans* biofilms have been evaluated. For the static system, questions could be raised whether “real” mature biofilms were obtained or rather adhering and accumulating planktonic cells. The Modified Robbins Device (MRD) proved to be an excellent system to grow biofilms in parallel under different conditions and to evaluate antibiofilm strategies. The densest biofilms were achieved in the CDC biofilm reactor, which is well suited for monitoring biofilm growth kinetically.

The golden standard for quantifying biofilm biomass is plating, although complete detachment of sessile cells from their surfaces is not obvious. In this work, the performance of “surrogate” assays, based on either the measurement of metabolic activity (the XTT and FDA assays) or the staining of a cellular element (the SYTO[®] 9, SYTOX[®] Green and PI assays), for quantifying both planktonic cells and biofilms have been evaluated. For *C. albicans* biofilms, the FDA assay was most useful. The XTT assay, though being the method of choice in the literature for quantifying yeast biomass in biofilms performed less favorably. The SYTO[®] 9 assay was most suitable for the quantification of *S. mutans* biofilms. The PI and SYTOX[®] Green assays were not able to detect dead cells in numbers required to assess antimicrobial effects.

Potentially antimycotic silicone was produced by loading it with nystatin before (“admixed”) and after (“impregnated”) curing. HPLC extracts of both types of silicone revealed that significant amounts of nystatin could be released. A disk diffusion test showed that the antimycotic effect of the silicone was correlated with this release. When *C. albicans* biofilms were grown on the “admixed” silicone, biofilms with reduced biomass were only found in the static system. In the MRDs and the CDC biofilm reactor, no effect of the nystatin on the biofilm development occurred, probably because the continuous flow of medium led to leaching of the antimycotic. These findings suggest a temporary burst effect of the loaded nystatin.

S. mutans produces glucosyltransferases (GTF), which catalyze the biosynthesis of extracellular polysaccharides. For the prevention of streptococcal biofilms, plant extracts (PE) were selected on the basis of their relationship to plants with known GTF inhibition properties. First, the antibacterial effect of these PE on *S. mutans* was examined in order to choose a concentration devoid of it. The microbial contamination of the PE was monitored to estimate their possible interference with the development of the streptococcal biofilms. *S. mutans* biofilms were grown in the MRDs in the presence and absence (= control) of PE in a sub-MIC concentration and the biomasses, determined in the SYTO[®] 9 assay were compared. Several extracts inhibited the *S. mutans* biofilm formation. To examine the inhibition of GTF by the PE, two enzyme assays were developed, one based on the cleavage of p-nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside, the other on the monitoring of the formation of dextran. Based on the results of the biofilm experiments and the second enzyme assay, the PE could be divided into four groups. The first group contained extracts that inhibited both the biofilm formation and the GTF, suggesting a causal relationship between both phenomena. The extracts that exhibited no effect on either the biofilm formation or GTF, fell into the second group. The third group consisted of extracts that had no influence on the GTF activity, although an inhibitory effect on the biofilm development was noticed. The latter was probably due to a non-GTF related mode of action. The fourth group contained PE that only inhibited GTF, but had no influence on the biofilm formation. The concentration of GTF inhibiting substances, unlike in the enzyme assay, in these extracts was probably too low to yield an effect in the biofilm system.

In conclusion, this work delivers “tools” for the study of the development and the prevention of yeast and bacterial biofilms. Follow-up research using these tools has pertained to the effect of chemically modified silicone surfaces on *C. albicans* biofilm formation, the study of gene expression in *C. albicans* biofilms and the testing of fractionated PE in connection with *S. mutans* biofilms. Other on-going “spin-off” studies are concerned with the prevention or elimination of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *Propionibacterium acnes* biofilms.

REFERENTIES

A

- Al-Fattani, M.A., Douglas, L.J., 2004. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3291-3297.
- Ameye, D., Honraet, K., Loose, D., Vermeersch, H., Nelis, H., Remon, J.P., 2005. Effect of a buccal bioadhesive nystatine tablet on the lifetime of a Provox™ silicone tracheoesophageal voice prosthesis. *Acta Otolaryngol.* 125, 304-306.
- Anderl, J.N., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobiol. Agents Chemother.* 44, 1818-1824.
- Andersen, J.B., Heydorn, A., Hentzer, M., Eberl, L., Geisenberger, O., Christensen, B.B., Molin, S., Givskov, M., 2001. Gfp-based N-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 575-585.
- Armstrong, R.A., Slade, S.V., Eperjesi, F., 2000. An introduction to analysis of variance (ANOVA) with special reference to data from clinical experiments in optometry. *Ophthal. Physiol. Opt.* 20, 235-241.
- Armstrong, R.A., Eperjesi, F., Gilmartin, B., 2002. The application of analysis of variance (ANOVA) to different experimental designs in optometry. *Ophthal. Physiol. Opt.* 22, 248-256.
- Armstrong, R., Hilton, A., 2004. The use of analysis of variance (ANOVA) in applied microbiology. *Microbiologist dec.*, pp. 18-21.
- Arweiler-Harbeck, D., Sanders, A., Held, M., Jerman, M., Ehrich, H., Jahnke, K., 2001. Does metal coating improve the durability of silicone voice prostheses? *Acta. Otolaryngol.* 121, 643-646.
- Ashby, M.J., Neale, J.E., Knott, S.J., Critchley, A.E., 1994. Effects of antibiotics on non-growing planktonic cells and biofilms of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemoth.* 33, 443-452.

B

Bachmann, S.P., Ramage, G., Vande Walle, K., Patterson, T.F., Wickes, B.L., López-Ribot, J.L., 2003. Antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3657-3659.

Badawi, H., Evans, R.D., Wilson, M., Ready, D., Noar, J.H., Pratten, J., 2003. The effect of orthodontic bonding materials on dental plaque accumulation and composition in vitro. *Biomaterials* 24, 3345-3350.

Baechni, P.C., Takeuchi, Y., 2003. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis.* 9, 23-29.

Baillie, G.S., Douglas, L.J., 1998. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1900-1905.

Baillie, G.S., Douglas, L.J., 1999. *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. *Methods Enzymol.* 310, 644-656.

Baillie, G.S., Douglas, L.J., 2000. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemoth.* 46, 397-403.

Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., Leibler, S., 2004. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305, 1622-1625.

Banas, J.A., Vickerman, M.M., 2003. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14, 89-99.

Barry, A.L., Brown, S.D., 1996. Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2154-2157.

Barry, A.L., Pfaller, M.A., Brown, S.D., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M.A., Knapp, C., Rennie, R.P., Rex, J.H., Rinaldi, M.G., 2000. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3457-3459.

Bassler, B.L., 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 582-587.

Bauer, W.D., Robinson, J.B., 2002. Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *Curr. Opin. Biotech.* 13, 234-237.

Bauters, T.G.M., Moerman, M., Vermeersch, H., Nelis, H.J., 2002. Colonization of voice prostheses by albicans and non-albicans *Candida* species. *Laryngoscope* 112, 708-712.

Bayston, R., 2004. Antimicrobials and 'implantable devices'. *sfam January Meeting 2004*, Microbial interactions with medical devices: a matter of life and death. Marriott Hotel, Gosforth Park, New Castle, UK, pp. 7-8.

Beck, J., Garcia, R., Heiss, G., Vokonas, P.S., Offenbacher, S., 1996. Periodontal disease and cardiovascular disease. *J. Periodontol.* 67, 1123-1137.

Bhatti, M.A., Hjertstedt, J., Hahn, B.L., Sohnle, P.G., 2002. Inefficient delivery of yeast cells as an explanation for reduced plating efficiency of *Candida albicans*. *Med. Mycol.* 40, 465-469.

Boelens, J.J., Tan, W.-F., Dankert, J., Zaat, S.A.J., 2000. Antibacterial activity of antibiotic-soaked polyvinylpyrrolidone-grafted silicon elastomer hydrocephalus shunts. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 45, 221-224.

Bos, R., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 179-230.

Bosch, J.A., Veerman, E.C.I., Turkenburg, M., Hartog, K., Bolscher, J.G.M., van Nieuw Amerongen, A., 2003. A rapid solid-phase fluorimetric assay for measuring bacterial adherence, using DNA-binding stains. *J. Microbiol. Methods.* 53, 51-56.

Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J., Desjardins, R., 1999. LIVE/DEAD® *BacLight*™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Methods* 37, 77-86.

Boyle, C.D., Kropp, B.R., 1992. Development and comparison of methods for measuring growth of filamentous fungi on wood. *Can. J. Microbiol.* 38, 1053-1060.

Bradshaw, D.J., Marsh, P.D., 1999. Use of continuous flow techniques in modeling dental plaque biofilms. *Methods Enzymol.* 310, 279-296.

Bradshaw, D.J., Marsh, P.D., Hodgson, R.J., Visser, J.M., 2002. Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within in vitro dental bacterial communities and biofilms. *Caries Res.* 36, 81-86.

Branda, S.S., Kolter, R., 2004. Multicellularity and biofilms. In: Ghannoum, M.A., O'Toole, G.A. (Eds), *Microbial biofilms*. ASM Press, Washington DC, USA, pp. 20-29.

Branda, S.S., Vik, A., Friedman, L., Kolter, R., 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13, 20-26.

Bridgett, M.J., Davies, M.C., Denyer, S.P., Eldridge, P.R., 1993. In-vitro assessment of bacterial adhesion to hydromer(R)-coated cerebrospinal-fluid shunts. *Biomaterials* 14, 184-188.

Brooun, A., Liu, S., Lewis, K., 2000. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 640-646.

Brown, A.J.P., 2002. Expression of growth form-specific factors during morphogenesis in *Candida albicans*. In: Calderone, R.A. (Ed.), *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington DC, USA. pp. 87-94.

Brown, D.H., Hilgers, F.J.M., Irish, J.C., Balm, A.J.M., 2003. Postlaryngectomy voice rehabilitation: state of the art at the millenium. *World J. Surg.* 27, 824-831.

Bunting, G.W., 2004. Voice following laryngeal cancer surgery: troubleshooting common problems after tracheoesophageal voice restoration. *Otolaryngol. Clin. N. Am.* 37, 597-612.

Busscher, H.J., de Boer, C.E., Verkerke, G.J., Kalicharan, R., Schutte, H. K., van der Mei, H.C., 1994. In-vitro ingrowth of yeasts into medical-grade silicone-rubber. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 33, 383-390.

Busscher, H.J., van Hoogmoed, C.G., Geertsema-Doornbusch, G.I., van der Kuijl-Booij, M., van der Mei, H.C., 1997. *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. *Applied Environ. Microbiol.*, 63, 3810-3817.

Busscher, H.J., Bruinsma, G., van Weissenbruch, R., Leunisse, C., van der Mei, H.C., Dijk, F., Albers, F.W.J., 1998. The effect of buttermilk consumption on biofilm formation on

silicone rubber voice prostheses in an artificial throat. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 255, 410-413.

Busscher H.J., Free, R.H., van Weissenbruch, R., Albers, F.W.J., van der Mei, H.C., 2000. Preliminary observations on influence of dairy products on biofilm removal from silicone rubber voice prostheses in vitro. J. Dairy Sci. 83, 641-647.

C

Calderone, R.A., 2002. Taxonomy and biology of *Candida*. In: Calderone, R.A. (Ed.), *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington DC, USA. pp. 15-28.

Caldwell, D.E., Wolfaardt, G.M., Korber, D.R., Lawrence, J.R., 1997. Do bacterial communities transcend Darwinism? Adv. Microb. Ecol. 15, 105-191.

Calich, V.L., Purchio, A., Paula, C.R., 1979. A new fluorescent viability test for fungi cells. Mycopathologia 66, 175-177.

Callow, M.E., Fletcher, R.L., 1994. The influence of low surface-energy materials on bioadhesion – a review. Int. Biodeterior. Biodegrad. 34, 333-348.

Carpentier, B., Cerf, O., 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. J. Appl. Bacteriol. 75, 499-511.

Cerca, N., Martins, S., Pier, G.B., Oliveira, R., Azeredo, J., 2005. The relationship between inhibition of bacterial adhesion to a solid surface by sub-MICs of antibiotics and subsequent development of a biofilm. Res. Microbiol. 156, 650-655.

Cescutti, P., Toffanin, R., Pollesello, P., Sutherland, I.W., 1999. Structural determination of the acidic exopolysaccharide produced by a *Pseudomonas* sp. strain 1.15. Carbohydr. Res. 315, 159-168.

Chalova, V., Woodward, C.L., Ricke, S.C., 2004. Fluorescent DNA binding dye-based approach for measuring the growth of an *Escherichia coli* lysine auxotroph and quantifying lysine. Rapid Methods Autom. Microbiol. 11, 313-324.

Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A., 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 183, 5385-5394.

Charlton, T.S., de Nys, R., Netting, A., Kumar, N., Hentzer, M., Givskov, M., Kjelleberg, S., 2000. A novel and sensitive method for the quantification of N-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm. *Environ. Microbiol.* 2, 530-541.

Christensen, B.E., Kjosbakken J., Smidsrød, O., 1985. Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine, periphytic *Pseudomonas* sp. strain NCMB 2021. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 837-845.

Christensen, B.E., 1989. The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *J. Biotechnol.* 10, 181-202.

Christensen, B.B., Sternberg, C., Andersen, J.B., Eberl, L., Møller, S., Givskov, M., Molin, S., 1998. Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2247-2255.

Christersson, C.E., Fornalik, M.S., Baier, R.E., Glantz, P.-O.J., 1987, In vitro attachment of oral microorganisms to solid surfaces: evaluation of a controlled flow method. *J. Dent. Res.* 95, 151-158.

Chryssanthou, E., Cuenca-Estrella, M., 2002. Comparison of the antifungal susceptibility testing subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing proposed standard and the E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility testing of yeast species. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3841-3844.

Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.-J., 1978. How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, 86-95.

Costerton, J.W., Cheng, K.-J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J., 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 435-464.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711-745.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.

Costerton, J.W., 2004. A short history of the development of the biofilm concept. In: Ghannoum, M.A., O'Toole, G.A. (Eds), *Microbial Biofilms*. ASM Press, Washington DC, USA, pp. 4-19.

Cox, A.J., Hukins, D.W., 1989. Morphology of mineral deposits on encrusted urinary catheters investigated by scanning electron microscopy. *J. Urol.* 142, 1347-1350.

Cuenca-Estrella, M., Lee-Yang, W., Ciblak, M.A., Arthington-Skaggs, B.A., Mellado, E., Warnock, D.W., Rodriguez-Tudela, J.L., 2002. Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrobial. Agents Chemother.* 46, 3644-3647.

Cummins, D., 1997. Vehicles, How to deliver the goods. *Periodontol.* 2000 15, 84-89.

Cury, J.A., Rebelo, M.A.B., Del Bel Cury, A.A., Derbyshire, M.T.V.C., Tabchoury, C.P.M., 2000. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res.* 34, 491-497.

D

Darouiche, R.O., Landon, G.C., Patti, J.M., Nguyen, L.L., Fernau, R.C., McDevitt, D., Greene, C., Foster, T., Klima, M., 1997. Role of *Staphylococcus aureus* surface adhesins in orthopaedic device infections: Are results model-dependent? *J. Med. Microbiol.* 46, 75-79.

Darouiche, R.O., Smith, J.A., Hanna, H., Dhabuwala, C.B., Steiner, M.S., Babaian, R.J., Boone, T.B., Scardino, P.T., Thornby, J.I., Raad, I.I., 1999. Efficacy of antimicrobial-impregnated bladder catheters in reducing catheter-associated bacteriuria: a prospective, randomized, multicenter clinical trial. *Urol.* 54, 976-981.

Darouiche, R.O., 2001. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clin. Infect. Dis.* 33, 1567-1572.

Darouiche, R.O., Donovan, W.H., Del Terzo, M., Thornby, J.I., Rudy, D.C., Hull, R.A., 2001. A pilot trial of bacterial interference for preventing urinary tract infection. *Urol.* 58, 339-344.

Das, J.R., Bhakoo, M., Jones, M.V., Gilbert, P., 1998. Changes in the biocide susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* cells associated with rapid attachment to plastic surfaces. *J. Appl. Microbiol.* 84, 852-858.

Davey, M.E., O'Toole, G.A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847-867.

Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295-298.

Davies, D., 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2, 114-122.

Deacon, J.W., 1997a. Chapter 2: structure and ultrastructure. In: Deacon, J.W. (Ed.), *Modern Mycology*. 3rd edition Blackwell Science Ltd., Cambridge, UK. pp. 29-46.

Deacon, J.W., 1997b. Chapter 4: differentiation. In: Deacon, J.W. (Ed.), *Modern Mycology*. 3rd edition Blackwell Science Ltd., Cambridge, UK. pp. 66-89.

Deacon, J.W., 1997c. Chapter 14: prevention and control of fungal growth. In: Deacon, J.W. (Ed.), *Modern Mycology*. 3rd edition Blackwell Science Ltd., Cambridge, UK. pp. 273-294.

De Beer, D., Srinivasan, R., Stewart, P.S., 1994a. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4339-4344.

De Beer, D., Stoodley, P., Roe, F., Lewandowski, Z., 1994b. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass-transport. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 1131-1138.

Degrassi, G., Uotila, L., Klima, R., Venturi, V., 1999. Purification and properties of an esterase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and identification of the encoding gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3470-3472.

De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Figueras, M.J., 2000. Atlas of Clinical Fungi. Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Nederland.

De Kievit, T.R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., Iglewski, B.H., 2001a. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1865-1873.

De Kievit, T.R., Parkins, M.D., Gillis, R.J., Srikumar, R., Ceri, H., Poole, K., Iglewski, B.H., Storey, D.G., 2001b. Multidrug efflux pumps: Expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 1761-1770.

De Rosa, S., Sconza, F., Volterra, L., 1998. Biofilm amount estimation by fluorescein diacetate. Water Res. 32, 2621-2626.

De Vos, M.M., Nelis, H.J., 2004. Evaluation of fluorescent stains for *Candida* species using solid phase cytometry. Mikol. Lek. 11, 51-52.

Devullapalle, K.S., Mooser, G., 1994. Subsite specificity of the active site of glucosyltransferases from *Streptococcus sobrinus*. J. Biol. Chem. 269, 11967-11971.

Dijk, F., Westerhof, M., Busscher, H.J., van Luyn, M.J.A., van der Mei, H.C., 2000. In vitro formation of oropharyngeal biofilms on silicone rubber treated with a palladium/tin salt mixture. J. Biomed. Mater. Res. 51, 408-412.

Dills, W.L., 1989. Sugar alcohols as bulk sweeteners. Ann. Rev. Nutr. 9, 161-186.

Donelli, G., Francolini, I., Piozzi, A., Di Rosa, R., Marconi, W., 2002. New polymer-antibiotic systems to inhibit bacterial biofilm formation: a suitable approach to prevent central venous catheter-associated infections. J. Chemother. 14, 501-507.

Dong, Y.-H., Wang, L.-H., Xu, J.-L., Zhang, H.-B., Zhang, X.-F., Zhang, L.-H., 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. Nature 411, 813-817.

Donlan, R.M., 2001a. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. Clin. Infect. Dis. 33, 1387-1392.

Donlan, R.M., 2001b. Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 277-281.

Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 881-890.

Donlan, R.M., Costeron, J.W., 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15, 167-193.

Donlan, R.M., Piede, J.A., Heyes, C.D., Sanii, L., Murga, R., Edmonds, P., El-Sayed, I., El-Sayed, M.A., 2004. Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms in situ and in real time. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4980-4988.

Douglas, L.J., 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 11, 30-36.

Dunne, W.M., 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 155-166.

Duarte, S., Koo, H., Bowen, W.H., Hayacibara, M.F., Cury, J.A., Ikegaki, M., Rosalen, P.L., 2003. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 527-531.

E

Eerenstein, S.E.J., Grolman, W., Schouwenburg, P.F., 1999. Microbial colonization of silicone voice prostheses used in larygectomized patients. *Clin. Otolaryngol.* 24, 398-403.

Eginton, P.J., Holah, J., Allison, D.G., Handley, P.S., Gilbert, P., 1998. Changes in strength of attachment of microorganisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents. *Lett. Appl. Microbiol.* 27, 101-105.

El-Azizi, M.A., Starks, S.E., Khardori, N., 2004. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 96, 1067-1073.

Ell, S.R., 1996. *Candida* – ‘the cancer of silastic’. *J. Laryngol. Otol.* 110, 240-242.

Ellepola, A.N.B., Samaranayake, L.P., 1998. Adhesion of oral *C. albicans* to human buccal epithelial cells following limited exposure to antifungal agents. *J. Oral Pathol. Med.* 27, 325-332.

Elvers, K.T., Lappin-Scott, H.M., 2000. Biofilms and Biofouling. In: Lederberg J. (Ed), Encyclopedia of Microbiology. The Rockefeller University, New York, USA, pp. 478-485.

Elving, G.J., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., van Nieuw Amerongen, A., Veerman, E.C.I., van Weissenbruch, R., Albers, F.W.J., 2000. Antimicrobial activity of synthetic salivary peptides against voice prosthetic microorganisms. Laryngoscope 110, 321-324.

Espinel-Ingroff, A., Rodríguez-Tudela, J.L., Martínez-Suárez, J.V., 1995. Comparison of two alternative microdilution procedures with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro testing of fluconazole-resistant and –susceptible isolates of *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. 33, 3154-3158.

Esposito, M., Hirsch, J., Lekholm, U., Thomsen, P., 1999. Differential diagnosis and treatment strategies for biologic complications and failing oral implants: a review of the literature. Int. J. Oral Maxillofac. Implants 14, 473-490.

Everaert, E.P.J.M., Mahieu, H.F., Wong Chung, R.P., Verkerke, G.J., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., 1997. A new method for in vivo evaluation of biofilms on surface-modified silicone rubber voice prostheses. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 254, 261-263.

Everaert, E.P.J.M., van de Belt-Gritter, B., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Verkerke, G.J., Dijk, F., 1998a. in vitro and in vivo microbial adhesion and growth on argon plasma-treated silicone rubber voice prostheses. J Mater. Sci. 9, 147-157.

Everaert, E.P.J.M., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., 1998b. Adhesion of yeasts and bacteria to fluoro-alkylsiloxane layers chemisorbed on silicone rubber. Colloid Surf. B-Biointerfaces 10, 179-190.

Everaert, E.P.J.M., Mahieu, H.F., van de Belt-Gritter, B., Peeters, A.J.G.E., Verkerke, G.J., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., 1999. Biofilm formation in vivo on perfluoro-alkylsiloxane-modified voice prostheses. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 125, 1329-1332.

F

Fang, H.H.P., Jia, X.S., 1996. Extraction of extracellular polymer from anaerobic sludges. *Biotechnol. Tech.* 10, 803-808.

Filler, S.G., Kullberg, B.J., 2002. Deep-seated Candidal infections. In: Calderone, R.A. (Ed.), *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington DC, USA, pp. 341-348.

Fletcher, M., Loeb, G.I., 1979. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 67-72.

Fonzi, W.A., Irwin, M.Y., 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Gen.* 134, 717-728.

Francolini, I., Norris, P., Piozzi, A., Donelli, G., Stoodley, P., 2004. Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4360-4365.

Free, R.H., van der Mei, H.C., Dijk, F., van Weissenbruch, R., Busscher, H.J., Albers, F.W.J., 2000. Biofilm formation on voice prostheses: influence of dairy products in vitro. *Acta Otolaryngol.* 120, 92-99.

Free, R.H., van der Mei, H.C., Elving, G.J., van Weissenbruch, R., Albers, F.W.J., Busscher, H.J., 2003. Influence of the Provox Flush[®], blowing and imitated coughing on voice prosthetic biofilms in vitro. *Acta Otolaryngol.* 123, 547-551.

Freydière, A.-M., Guinet, R., Boiron, P., 2001. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med. Mycol.* 39, 9-33.

Freydière, A.-M., Parant, F., Noel-Baron, F., Crepy, M., Treny, A., Raberin, H., Davidson, A., Odds, F.C., 2002. Identification of *Candida glabrata* by a 30-second trehalase test. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3602-3605.

Fuqua, C., Greenberg, E.P., 2002. Listening in on bacteria: Acyl-homoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 685-695.

Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., Stoodley, P., 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *TRENDS microbiol.* 13, 34-40.

G

Gales, A.C., Pfaller, M.A., Houston, A.K., Joly, S., Sullivan, D.J., Coleman, D.C., Soll, D.R., 1999. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and alfa-methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and Vitek YBC systems. J. Clin. Microbiol. 37, 3804-3808.

García-Sánchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J.-M., d'Enfert, C., 2004. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. Eukaryotic Cell 3, 536-545.

Geesey, G.G., Richardson, W.T., Yeomans, H.G., Irvin, R.T., Costerton, J.W., 1977. Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. Can. J. Microbiol. 23, 1733-1736.

Ghannoum, M.A., Rice, L.B., 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin. Microbiol. Rev. 12, 501-517.

Ghigo, J.-M., 2003. Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? Res. Microbiol. 154,1-8.

Gilbert, P., McBain, A.J., 2001. Biofilms: their impact on health and their recalcitrance toward biocides. Am. J. Infect. Control 29, 252-255.

Goeres, D.M., Loetterle, L.R., Hamilton, M.A., Murga, R., Kirby, D.W., Donlan, R.M., 2005. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. Microbiol. 151, 757-762.

González-Pastor, J.E., Hobbs, E.C., Losick, R., 2003. Cannibalism by sporulating bacteria. Science 301, 510-513.

Gordon, C.A., Hodges, N.A., Marriott, C., 1988. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemoth. 22, 667-674.

Gottenbos, B., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., Nieuwenhuis, P., 2002a. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. J. Mater. Sci.-Mater. Med. 13, 717-722.

Gottenbos, B., van der Mei, H.C., Klatter, F., Nieuwenhuis, P., Busscher, H.J., 2002b. In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber. *Biomaterials* 23, 1417-1423.

Greenman, J., McKenzie, C., Nelson, D.G.A., 1997. Effects of triclosan and triclosan monophosphate on maximum specific growth rates, biomass, and hydrolytic enzyme production of *Streptococcus sanguis* and *Capnocytophaga gingivalis* in continuous culture. *J. Antimicrob. Chemoth.* 40, 659-666.

Gristina, A.G., Dobbins, J.J., Giammara, B., Lewis, J.C., DeVries, W.C., 1988. Biomaterial-centered sepsis and the total artificial heart: microbial adhesion versus tissue integration. *J. Am. Med. Assoc.* 259, 870-877.

Groll, A.H., Mickiene, D., Werner, K., Piscitelli, S.C., Walsh, T.J., 1999. High-performance liquid chromatographic determination of liposomal nystatin in plasma and tissues for pharmacokinetic and tissue distribution studies. *J. Chromatography B* 735, 51-62.

Groll, A.H., Mickiene, D., Werner, K., Petraitiene, R., Petraitis, V., Calendario, M., Field-Ridley, A., Crisp, J., Piscitelli, S.C., Walsh, T.J., 2000. Compartmental pharmacokinetics and tissue distribution of multilamellar liposomal nystatin in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 950-957.

Gu, J.-D., 2003. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 52, 69-91.

Guggenheim, B., Giersten, E., Schüpbach, P., Shapiro, S., 2001. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J. Dent. Res.* 80, 363-370.

Guldfeldt, L.U., Arneborg, N., Siegumfeldt, H., Jespersen, L., 1998. Relationship between yeast cell proliferation and intracellular esterase activity during brewing fermentations. *J. Inst. Brew.* 104, 333-338.

H

Hahn Berg, I.C., Kalfas, S., Malmsten, M., Arnebrant, T., 2001. Proteolytic degradation of oral biofilms in vitro and in vivo: potential of proteases originating from *Euphasia superba* for plaque control. *Eur. J. Oral Sci.* 109, 316-324.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95-108.

Hamada, S., Ooshima, T., Fujiwara, T., Minami, T., Kimura, S., 1996. Development of preventive measures based on the aetiology of dental caries: a review. *Microb. Ecol. Health Dis.* 9, 349-357.

Hamilton-Miller, J.M.T., 2001. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J. Med. Microbiol.* 50, 299-302.

Hashimoto, K., Yanagi, K., Fukushima, K., Uda, Y., 2001. Effect of 3-hydroxymethylene-2-thioxopyrrolidine on growth of two species of mutans streptococci and their in vitro plaque formation. *J. Antimicrob. Agents* 17, 97-102.

Hatch, R.A., Schiller, N.L., 1998. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 974-977.

Hattori, M., Kusumoto, I.T., Namba, T., Ishigami, T., Hara, Y., 1990. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Pharm. Bull.* 18, 717-720.

Hausner, M., Wuertz, S., 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3710-3713.

Hawser, S.P., L.J., Douglas, 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect. Immun.* 62, 915-921.

Hawser, S.P., Douglas, L.J., 1995. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2128-2131.

Hawser, S., 1996. Adhesion of different *Candida* spp. to plastic: XTT formazan determinations. *J. Med. Vet. Mycol.* 34, 407-410.

Hawthorn, L.A., Reid, G., 1990. Exclusion of uropathogen adherence to polymer surfaces by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Biomed. Mater. Res.* 24, 39-46.

Hayes, F., 2003. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 301, 1496-1499.

Hazen, K.C., Baron, E.J., Colombo, A.L., Girmenia, C., Sanchez-Sousa, A., del Palacio, A., de Bedout, C., Gibbs, D.L., the global antifungal surveillance group, 2003. Comparison of the susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole and voriconazole in a 4-year global evaluation using disk diffusion. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5623-5632.

Heersink, J., 2003. Basic biofilm analytical methods. In: Hamilton, M., Heersink, J., Buckingham-Meyer, K., Goeres, D. (eds), *The biofilm laboratory: step-by-step protocols for experimental design, analysis, and data interpretation*, Cytergy publishing, Bozeman, USA, pp. 16-23.

Henrici, A.T., 1933. Studies of fresh water bacteria. 1. A direct microscopic technique. *J. Bacteriol.* 25, 277-286.

Hentzer, M., Teitzel, G.M., Balzer, G.J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M., Parsek, M.R., 2001. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.* 183, 5395-5401.

Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., Parsek, M.R., Rice, S.A., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N., Kjelleberg, S., Givskov, M., 2002. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiol.* 148, 87-102.

Hentzer, M., Givskov, M., 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.* 112, 1300-1307.

Hentzer, M., Eberl, L., Nielsen, J., Givskov, M., 2003a. Quorum sensing: a novel target for the treatment of biofilm infections. *Biodrugs* 17, 241-250.

Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J.B., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M.A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J.W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Høiby, N., Givskov, M., 2003b. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.* 22, 3803-3815.

Herles, S., Olsen, S., Afflitto, J., Gaffar, A., 1994. Chemostat flow cell system: an in vitro model for the evaluation of antiplaque agents. J. Dent. Res. 73, 1748-1755.

Hilgers, F.J.M., Balm, A.J.M., Gregor, R.T., Scholtens, B.E.G.M., Ackerstaff, A.H., 1995. The Provox® System, a practical guide to post-laryngectomy vocal and pulmonary rehabilitation. The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, the Netherlands.

Hilgers, F.J.M., Ackerstaff, A.H., Balm, A.J.M., van den Brekel, M.W.M., Tan, I.B., Persson, J.O., 2003. A new problem-solving indwelling voice prosthesis, eliminating the need for frequent *Candida*- and “underpressure”-related replacements: Provox ActiValve. Acta Otolaryngol. 123, 972-979.

Hitchcock, C.A., Dickinson, K., Brown, S.B., Evans, E.G., Adams, D.J., 1990. Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P450-dependent 14 alpha-sterol demethylase purified from *Candida albicans*. J. Biochem. 266, 475-480.

Hope, C.K., Clements, D., Wilson, M., 2002. Determining the spatial distribution of viable and nonviable bacteria in hydrated microcosm dental plaques by viability profiling. J. Appl. Microbiol. 93, 448-455.

Hsieh, P.-C., Siegel, S.A., Rogers, B., Davis, D., Lewis, K., 1998. Bacteria lacking a multidrug pump: a sensitive tool for drug discovery. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 6602-6606.

Huber, B., Eberl, L., Feucht, W., Polster, J., 2003. Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. Z. Naturforsch. 58c, 879-884.

Hunt, S.M., Werner, E.M., Huang, B., Hamilton, M.A., Stewart, P.S., 2004. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. Appl. Environ. Microbiol. 70, 7418-7425.

I

Imbert, C., Bernardin, A., Imbert-Bouyer, S., Daniault, G., Jacquemin, J.L., Rodier, M.H., 2003. Influence of the pre-treatment of plastic materials with povidone iodine on metabolism and adherence of *Candida* yeasts. J. Mycol. Med. 13, 123-128.

Ito, K., Nakamura, Y., Tokunaga, T., Iijima, D., Fukushima, K., 2003. Anti-cariogenic properties of a water-soluble extract from cacao. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 2567-2573.

Izdebski, K., Ross, J.C., Lee, S., 1987. Fungal colonization of tracheoesophageal voice prosthesis. *Laryngoscope* 97, 594-597.

J

Jackson, D.W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J.W., Hart, M.E., Romeo, T., 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184, 290-301.

Jahn, A., Nielsen, P.H., 1998. Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Water Sci. Technol.* 37, 17-24.

Jefferson, K.K., 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 163-173.

Jin, Y., Samaranayake, L.P., Samaranayake, Y., Yip, H.K., 2004. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch. Oral Biol.* 49, 789-798.

Jones, C.G., 1997. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol.* 2000 15, 55-62.

K

Kao, C.C., Barlow, E., Sequeira, L., 1992. Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.* 174, 1068-1071.

Kaplan, J.B., Meyenhofer, M.F., Fine, D.H., 2003a. Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Bacteriol.* 185, 1399-1404.

Kaplan, J.B., Ragunath, C., Ramasubbu, N., Fine, D.H., 2003b. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. *J. Bacteriol.* 185, 4693-4698.

-
- Karyotakis, N.C., Anaissie, E.J., Hachem, R., Dignani, M.C., Samonis, G., 1993. Comparison of the efficacy of polyenes and triazoles against hematogenous *Candida krusei* infection in neutropenic mice. *J. Infect. Dis.* 168, 1311-1313.
- Kasperbauer, J.L., Thomas, J.E., 2004. Voice rehabilitation after near-total laryngectomy. *Otolaryngol. Clin. N. Am.* 37, 655-677.
- Katiyar, S.K., Edlind, T.D., 2001. Identification and expression of multidrug resistance-related ABC transporter genes in *Candida krusei*. *Med. Mycol.* 39, 109-116.
- Kaufman, H.W., Kleinberg, I., 1973. X-ray diffraction examination of calcium phosphate in dental plaque. 11, 97-104.
- Kawashima, M., Hanada, N., Hamada, T., Tagami, J., Senpuku, H., 2003. Real-time interaction of oral streptococci with human salivary components. *Oral Microbiol. Immun.* 18, 220-225.
- Kearney, A., 2004. Nontracheoesophageal speech rehabilitation. *Otolaryngol. Clin. N. Am.* 37, 613-625.
- Kelly, N.M., Kluftinger, J.L., Pasloske, B.L., Paranchych, W., Hancock, R.E., 1989. *Pseudomonas aeruginosa* pili as ligands for nonopsonic phagocytosis by fibronectin-stimulated macrophages. *Infect. Immun.* 57, 3841-3845.
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., Lewis, K., 2004a. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 8172-8180.
- Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., Lewis, K., 2004b. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol. Lett.* 230, 13-18.
- Klausen, M., Aaes-Jørgensen, M., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol. Microbiol.* 50, 61-68.
- Kinniment, S.L., Wimpenny, J.W., Adams, D., Marsh, P.D., 1996. Development of a steady-state oral microbial biofilm community using the constant-depth film fermenter. *Microbiol.* 142, 631-638.

Koch, A.L., 1994. Growth measurement. In : Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. (Eds), Methods for general and molecular bacteriology. ASM Press, Washington D.C., USA, pp. 248-277.

Kohnen, W., Kolbenschlag, C., Teske-Keiser, S., Jansen, B., 2003. Development of a long-lasting ventricular catheter impregnated with a combination of antibiotics. Biomaterials 24, 4865-4869.

Kontoyiannis, D.P., Lewis, R.E., 2002. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. Lancet 359, 1135-1144.

Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Ambrosano, G.M.B., Murata, R.M., Yatsuda, R., Ikegaki, M., Alencar, S.M., Park, Y.K., 2000. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. Curr. Microbiol. 41, 192-196.

Koo, H., Hayacibara, M.F., Schobel, B.D., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Park, Y.K., Vacca-Smith, A.M., Bowen, W.H., 2003. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. J. Antimicrob. Chemoth. 52, 782-789.

Korpela, A., Yu, X., Loimaranta, V., Lenander-Lumikari, M., Vacca-Smith, A., Wunder, D., Bowen, W.H., Tenovuo, J., 2002. Lactoperoxidase inhibits glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* in vitro. Caries Res. 36, 116-121.

Kuhn, D.M., Chandra, J., Mukherjee, P.K., Ghannoum, M.A., 2002. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. Infect. Immun. 70, 878-888.

Kuhn, D.M., Balkis, M., Chandra, J., Mukherjee, P.K., Ghannoum, M.A., 2003. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. J. Clin. Microbiol. 41, 506-508.

Kuhn, D.M., Ghannoum, M.A., 2004. *Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. Curr. Opin. Invest. Drugs 5, 186-197.

Kullberg, B.J., Filler, S.G., 2002. Candidemia. In: Calderone, R.A. (Ed.), *Candida* and Candidiasis. ASM Press, Washington DC, USA, pp. 327-340.

Kumamoto, C.A., 2002. *Candida* biofilms. Curr. Opin. Microbiol. 5, 608-611.

Kumon, H., Tomochika, K., Matunaga, T., Ogawa, M., Ohmori, H., 1994. A sandwich cup method for the penetration assay of antimicrobial agents through *Pseudomonas* exopolysaccharides. Microbiol. Immunol. 38, 615-619.

L

Lai, P.K., Roy, J., 2004. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. Curr. Med. Chem. 11, 1451-1460.

Lappin-Scott, H.M., Bass, C., 2001. Biofilm formation: Attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces. Am. J. Infect. Control 29, 250-251.

Larone, D.H., 1995. Medically important fungi, a guide to identification. ASM Press, Washington DC, USA.

Larsen, T., Fiehn, N.-E., 1995. Development of a flow method for susceptibility testing of oral biofilms in vitro. APMIS 103, 339-344.

Larsen, T., Fiehn, N.-E., 1996. Resistance of *Streptococcus sanguis* biofilms to antimicrobial agents. APMIS 104, 280-284.

Larsen, T., Stoltze, K., Fiehn, N.-E., 1997. Susceptibility of biofilms of *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces naeslundii* to chlorhexidine. Biofilm J. 2, paper 1.

Lawman, P., Bleiweis, A.S., 1991. Molecular cloning of the extracellular endodextranase of *Streptococcus salivarius*. J. Bacteriol. 173, 7423-7428.

Lawrence, J.R., Korber, D.R., Hoyle, B.D., Costerton, J.W., Caldwell, D.E., 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. J. Bacteriol. 173, 6558-6567.

Lawrence, J.R., Neu, T.R., Swerhone, G.D.W., 1998. Application of multiple parameter imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial biofilms. J. Microbiol. Methods 32, 253-261.

Lazazzera, B.A., 2005. Lessons from DNA microarray analysis: the gene expression profile of biofilms. Curr. Opin. Microbiol. 8, 222-227.

Leadbetter, J.R., Greenberg, E.P., 2000. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. J. Bacteriol. 182, 6921-6926.

Leber, R., Fuchsbichler, S., Klobučníková, V., Schweighofer, N., Pitters, E., Wohlfarter, K., Lederer, M., Landl, K., Ruckenstuhl, C., Hapala, I., Turnowsky, F., 2003. Molecular mechanisms of terbinafine resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 3890-3900.

Leunisse, C., van Weissenbruch, R., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., Dijk, F., Albers, F.W.J., 2001. Biofilm formation and design features of indwelling silicone rubber tracheoesophageal voice prostheses – an electron microscopical study. J. Biomater. Mater. Res. 58, 556-563.

Lewandowski, Z., Stoodley, P., Altobelli, S., Fukushima, E., 1994. Hydrodynamics and kinetics in biofilm systems – recent advances and new problems. Wat. Sci. Tech. 29, 223-229.

Lewandowski, Z., Stoodley, P., Altobelli, S., 1995. Experimental and conceptual studies on mass-transport in biofilms. Water Sci. Technol. 31, 153-162.

Lewis, K., 2001. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 999-1007.

Limsong, J., Benjavongkulchai, E., Kuvatanasuchati, J., 2004. Inhibitory effects of some herbals extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. J. Ethnopharmacol. 92, 281-289.

Linke, H.A.B., LeGeros, R.Z., 2003. Black tea extract and dental caries formation in hamsters. Int. J. Food Sci. Nut. 54, 89-95.

Liu, H., Fang, H.H.P., 2002. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. J. Biotechnol. 95, 249-256.

Lloyd, A.W., 2004. Biomimetic surfaces to reduce bacterial adhesion to medical devices. sfam January meeting 2004, Microbial interactions with medical devices: a matter of life and death. Marriott Hotel, Gosforth Park, Newcastle, UK, pp. 13-14.

Loffler, J., Kelly, S.L., Hebart, H., Schumacher, U., LassFlorl, C., Einsele, H., 1997. Molecular analysis of CYP51 from fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. FEMS Microbiol. Lett. 151, 263-268.

Loffler, J., Einsele, H., Hebart, H., Schumacher, U., Hrastnik, C., Daum, G., 2000. Phospholipid and sterol analysis of plasma membranes of azole-resistant *Candida albicans* strains. FEMS microbiol. Lett. 185, 59-63.

Loiselle, M., Anderson, K.W., 2003. The use of cellulase in inhibiting biofilm formation from organisms commonly found on medical implants. Biofouling 19, 77-85.

Lopez-Ribot, J.L., McAtee, R.K., Lee, L.N., Kirkpatrick, W.R., White, T.C., Sanglard, D., Patterson, T.F., 1998. Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. Antimicrob. Agents Chemother. 42, 2932-2937.

Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M., Kelly, S., 2002. Molecular basis of resistance to azole antifungals. Trends Mol. Med. 8, 76-81.

Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., Dodd, C.E.R., Williams, P., 2002. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. Environ. Microbiol. 4, 18-28.

M

Mack, D., Fisher, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., Laufs, R., 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. J. Bacteriol. 178, 175-183.

Mah, T.-F.C., O'Toole, G.A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol. 9, 34-39.

Mah, T.-F.C., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., O'Toole, G.A., 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. Nature 426, 306-310.

Mahenthiralingam, E., Campbell, M.E., Speert, D.P., 1994. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 62, 596-605.

Mahieu, H.F., Van Saene, H.K.F., Rosingh, H.J., Schutte, H.K., 1986. *Candida* vegetations on silicone voice prostheses. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 112, 321-325.

Maira-Litrán, T., Allison, D.G., Gilbert, P., 2000a. An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) and the multidrug efflux pump *acrAB* to moderate resistance towards ciprofloxacin in *Escherichia coli* biofilms. *J. Antimicrob. Chemoth.* 45, 789-795.

Maira-Litrán, T., Allison, D.G., Gilbert, P., 2000b. Expression of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) during growth of *Escherichia coli* as a biofilm. *J. Appl. Microbiol.* 88, 243-247.

Malcolm, R.K., McCullagh, S.D., Woolfson, A.D., Gorman, S.P., Jones, D.S., Cuddy, J., 2004. Controlled release of a model antibacterial drug from a novel self-lubricating silicone biomaterial. *J. Control. Rel.* 313-320.

Marichal, P., Gorrens, J., Coene, M.C., LeJeune, L., Vanden Bossche, H., 1995. Origin of differences in susceptibility of *Candida krusei* to azole antifungal agents. *Mycoses* 38, 111-117.

Marichal, P., Vanden Bossche, H., Odds, F.C., Nobels, G., Warnock, D.W., Timmerman, V., Van Broeckhoven, C., Fay, S., Mose-Larsen, P., 1997. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2229-2237.

Marr, K.A., Lyons, C.N., Rustad, T., Bowden, R.A., White, T.C., 1998. Rapid, transient fluconazole resistance in *Candida albicans* is associated with increased mRNA levels of *CDR*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2584-2589.

Marrie, T.J., Lam, J., Costerton, J.W., 1980. Bacterial adhesion to uroepithelial cells - a morphological study. *J. Infect. Dis.* 142, 239-246.

-
- Marrie, T.J., Nelligan, J., Costerton, J.W., 1982. A scanning and transmission electron-microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation*. 66, 1339-1341.
- Marsh, P.D., 2003. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Dis*. 9, 16-22.
- Marshall, K.C., Stout, R., Mitchell, R., 1971. Mechanisms of initial events in the sorbtion of marine bacteria to surfaces. *J. Gen. Microbiol*. 68, 337-348.
- Marty, A., Finkelstein, A., 1975. Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin. *J. Gen. Physiol*. 65, 515-526.
- Matsumara, M., Izumi, T., Matsumoto, M., Tsuji, M., Fujiwara, T., Ooshima, T., 2003. The role of glucan-binding proteins in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Immunol*. 47, 213-215.
- Mattos-Graner, R.O., Smith, D.J., King, W.F., Mayer, M.P., 2000. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J. Dent. Res*. 79, 1371-1377.
- Mattos-Graner, R.O., Napimoga, M.H., Fukushima, K., Duncan, M.J., Smith, D.J., 2004. Comparative analysis of Gtf isozyme production and diversity in isolates of *Streptococcus mutans* with different biofilm growth phenotypes. *J. Clin. Microbiol*. 42, 4586-4592.
- Maximilien, R., de Nys, R., Holmström, C., Gram, L., Givskov, M., Crass, K., Kjelleberg, S., Steinberg, P.D., 1998. Chemical mediation of bacterial surface colonisation by secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra*. *Aquat. Microb. Ecol*. 15, 233-246.
- McGinnis, M.R., Rinaldi, M.G., 1991. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biological fluids. In: Lorian, V. (Ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, third edition. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, pp. 198-257.
- McLean, R.J.C., Whiteley, M., Stickler, D.J., Fuqua, C.W., 1997. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiol. Lett*. 154, 259-263.
- McNeill, K., Hamilton, I.R., 2003. Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett*. 221, 25-30.

Meshulam, T., Levitz, S.M., Christin, L., Diamond, R.D., 1995. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT). J. Infect. Dis. 172, 1153-1156.

Meulenbeld, G.H., Zuilhof, H., Van Veldhuizen, A., Van Den Heuvel, R.H.H., Hartmans, S., 1999. Enhanced (+)-catechin transglucosylating activity of *Streptococcus mutans* GS-5 glucosyltransferase-D due to fructose removal. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4141-4147.

Meulenbeld, G.H., Hartmans, S., 2000. Transglycosylation by *Streptococcus mutans* GS-5 glucosyltransferase-D: acceptor specificity and engineering of reaction conditions. Biotechnol. Bioeng. 70, 363-369.

Mitchell, E., Houles, C., Sudakevitz, D., Wimmerova, M., Gautier, C., Pérez, S., Wu, A.M., Gilboa-Garber, N., Imberty, A., 2002. Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. Nat. Struct. Biol. 9, 918-921.

Monchois, V., Reverte, A., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., Willemot, R.-M., 1998. Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranase carboxy-terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1644-1649.

Moran, G.P., Sullivan, D.J., Coleman, D.C., 2002. Emergence of Non-*Candida albicans* *Candida* species as pathogens. In: Calderone, R.A. (Ed.), *Candida* and Candidiasis. ASM Press, Washington DC, USA, pp. 37-54.

Mosel, D.D., Dumitru, R., Hornby, J.M., Atkin, A.L., Nickerson, K.W., 2005. Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. Appl. Environ. Microbiol. 71, 4938-4940.

Mukherjee, P.K., Chandra, J., Kuhn, D.M., Ghannoum, M.A., 2003. Mechanisms of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. Infect. Immun. 71, 4333-4340.

Murata, M., Nakajima, Y., Homma, S., 1995. Inhibition of cariogenic glucan synthesis by dark beer. Lebensm.-Wiss. U.-Technol. 28, 201-207.

Murchinson, H., Larrimore, S., Curtiss, R., 1985. In vitro inhibition of adherence of *Streptococcus mutans* strains by nonadherent mutants of *S. mutans* 6715. Infect. Immun. 50, 826-832.

Murray, M.P., Zinchuk, R., Larone, D.H., 2005. CHROMagar Candida as the sole primary medium for isolation of yeasts and as a source medium for the rapid-assimilation-of-trehalose test. J. Clin. Microbiol. 43, 1210-1212.

N

Nakahara, K., Kawabata, S., Ono, H., Ogura, K., Tanaka, T., Ooshima, T., Hamada, S., 1993. Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of mutans streptococci. Appl. Environ. Microbiol. 59, 968-973.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, USA.

Nemoto, K., Hirota, K., Ono, T., Murakami, K., Murakami, K., Nagao, D., Miyake, Y., 2000. Effect of varidase (streptokinase) on biofilm formed by *Staphylococcus aureus*. Chemotherapy 46, 111-115.

Netscher, D.T., Weizer, G., Wigoda, P., Walker, L.E., Thornby, J., Bowen, D., 1995. Clinical relevance of positive breast periprosthetic cultures without overt infection. Plast. Reconstr. Surg. 96, 1125-1129.

Neu, T.R., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Dijk, F., Verkerke, G.J., 1993. Biodeterioration of medical-grade silicone-rubber used for voice prostheses- a SEM study. Biomaterials 14, 459-464.

Neu, T.R., Verkerke, G.J., Herrmann, I.F., Schutte, H.K., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., 1994. Microflora on explanted silicone rubber voice prostheses: taxonomy, hydrophobicity and electrophoretic mobility. J. Appl. Bacteriol. 76, 521-528.

Newby, P., 2000. Rapid methods for enumeration and identification in microbiology. In: Baird, R.M., Hodges, N.A., Nenyer, S.P. (Eds), Handbook of microbiological quality control. Taylor & Francis, New York, NY, USA, pp. 107-117.

Nichols, W.W., Dorrington, S.M., Slack, M.P.E., Walmsley, H.L., 1988. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 518-523.

Nichols, W.W., Evans, M.J., Slack, M.P.E., Walmsley, H.L., 1989. The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 1291-1303.

Nickel, J.C., Ruseska, I., Wright, J.B., Costerton, J.W., 1985. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27, 619-624.

Nivens, D.E., Ohman, D.E., Williams, J., Franklin, M.J., 2001. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J. Bacteriol.* 183, 1047-1057.

Nolte, F.S., Parkinson, T., Falconer, D.J., Dix, S., Williams, J., Gilmore, C., Geller, R., Wingard, J.R., 1997. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrobial. Agents Chemother.* 44, 196-199.

O

Odds, F.C., Bernaerts, R., 1994. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1923-1929.

Olofsson, A.C., Hermansson, M., Elwing, H., 2003. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4814-4822.

Ooshima, T., Osaka, Y., Sasaki, H., Osawa, K., Yasuda, H., Matsumura, M., Sobue, S., Matsumoto, M., 2000. Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in in-vitro and animal experiments. *Arch. Oral Biol.* 45, 639-645.

Ooshima, T., Matsumura, M., Hoshino, T., Kawabata, S., Sobue, S., Fujiwara, T., 2001. Contributions of three glucosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.* 80, 1672-1677.

Oosterhof, J.J.H., Elving, G.J., Stokroos, I., Van Nieuw Amerongen, A., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., van Weissenbruch, R., Albers, F.W.J., 2003. The influence of antimicrobial peptides and mucolytics on the integrity of biofilms consisting of bacteria and yeasts as affecting voice prosthetic air flow resistances. *Biofouling* 19, 347-353.

Oosterhof, J.J.H., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Free, R.H., Kaper, H.J., van Weissenbruch, R., Albers, F.W.J., 2004. In vitro leakage susceptibility of tracheoesophageal shunt prostheses in the absence and presence of a biofilm. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 73B, 23-28.

Op de Coul, B.M.R., Hilgers, F.J.M., Balm, A.J.M., Tan, I.B., van den Hoogen, F.J.A., van Tinteren, H., 2000. A decade of postlaryngectomy vocal rehabilitation in 318 patients. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 126, 1320-1328.

Orozco, A.S., Higginbotham, L.M., Hitchcock, C.A., Parkinson, T., Falconer, D., Ibrahim, A.S., Ghannoum, M.A., Filler, S.G., 1998. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2645-2649.

Otake, S., Makimura, M., Kuroki, T., Nishihara, Y., Hirasawa, M., 1991. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res.* 25, 438-443.

O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49-79.

Ott, C.M., Day, D.F., Koenig, D.W., Pierson, D.L., 2001. The release of alginate lyase from growing *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. *Curr. Microbiol.* 42, 78-81.

Overman, P.R., 2000. Biofilm: a new view of plaque. *J. Cont. Dent. Pract.* 1, 1-8.

P

Palmer, R.R., Lewis, A.L., Kirkwood, L.C., Rose, S.F., Lloyd, A.W., Vick, T.A., Stratford, P.W., 2004. Biological evaluation and drug delivery application of cationically modified phospholipid polymers. *Biomaterials* 25, 4785-4796.

Park, K.K., Schemehorn, B.R., Stookey, G.K., Butchko, H.H., Sanders, P.G., 1995. Acidogenicity of high-intensity sweeteners and polyols. *Am. J. Dent.* 8, 23-26.

Park, S.-Y., Lee, S.-J., Oh, T.-K., Oh, J.-W., Koo, B.-T., Yum, D.-Y., Lee, J.-K., 2003. AhID an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. Microbiol. 149, 1541-1550.

Parsek, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., Greenberg, E.P., 1999. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing generation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4360-4365.

Parsek, M.R., Greenberg, E.P., 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8789-8793.

Parsek, M.R., Singh, P.K., 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annu. Rev. Microbiol. 57, 677-701.

Paull, K.D., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R., Parsons, J.L., Risbood, P.A., Barbera, W.A., Sharma, M.N., Baker, D.C., Hand, E., Scudiero, D.A., Monks, A., Alley, M.C., Grote, M., 1988. The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bio-reducible to a water-soluble formazan. J. Heterocyclic Chem. 25, 911-914.

Peltroche-Llacsahuanga, H., Schnitzler, N., Lütticken, R., Haase, G., 1999. Rapid identification of *Candida glabrata* by using a dipstick to detect trehalase-generated glucose. J. Clin. Microbiol. 37, 202-205.

Percival, S.L., Walker, J.T., 1999. Potable water and biofilms: a review of the public health implications. Biofouling 14, 99-115.

Pierson, E.A., Wood, D.W., Cannon, J.A., Blachere, F.M., Pierson, L.S., 1998. Interpopulation signaling via N-acyl-homoserine lactones among bacteria in the wheat rhizosphere. Mol. Plant-Microbe Interact. 11, 1078-1084.

Pigno, M.A., Goldschmidt, M.C., Lemon, J.C., 1994. The efficacy of antifungal agents incorporated into a facial prosthetic silicone elastomer. J. Prosthet. Dent. 71, 295-300.

Pinjon, E., Sullivan, D., Salkin, I., Shanley, D., Coleman, D., 1998. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. 36, 2093-2095.

Piozzi, A., Francolini, I., Occhiaperti, L., Venditti, M., Marconi, W., 2004. Antimicrobial activity of polyurethanes coated with antibiotics: a new approach to the realization of medical devices exempt from microbial colonization. *Int. J. Pharm.* 280, 173-183.

Pitten, F.-A., Doering, S., Kramer, A., Rosin, M., 2003. In vitro assay for the screening of the plaque-reducing activity of antimicrobial agents. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 53, 182-187.

Pou, A.M., 2004. Tracheoesophageal voice restoration with total laryngectomy. *Otolaryngol. Clin. N. Am.* 37, 531-545.

Pringent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., Lejeune, P., 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 5993-6002.

Pringle, J.H., Fletcher, M., 1983. Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 811-817.

R

Raad, I.I., Luna, M., Khalil, S., Costerton, J.W., Lam, C., Bodey, G.P., 1994. The relationship between the thrombotic and infectious complications of central venous catheters. *JAMA* 271, 1014-1016.

Raad, I., Hanna, H., 1999. Intravascular catheters impregnated with antimicrobial agents: a milestone in the prevention of bloodstream infections. *Support. Care Cancer* 7, 386-390.

Raad, I., Chatzinikolaou, I., Chaiban, G., Hanna, H., Hachem, R., Dvorak, T., Cook, G., Costerton, W., 2003. In vitro and ex vivo activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces. *Antimicrobial. Agents Chemother.* 47, 3580-3585.

Raffa, R.B., Iannuzzo, J.R., Levine, D.R., Saeid, K.K., Schwartz, R.C., Sucic, N.T., Terleckyj, O.D., Young, J.M., 2005. Bacterial communication ("quorum sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacological target for the design of antibiotic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312, 417-423.

Ramage, G., Wickes, B.L., López-Ribot, J.L., 2001a. Biofilms of *Candida albicans* and their associated role in resistance to antifungal agents. *Am. Clin. Lab.* 20, 42-44.

Ramage, G., Vande Walle, K., Wickes, B.L., López-Ribot, J.L., 2001b. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3234-3240.

Ramage, G., Vande Walle, K., Wickes, B.L., López-Ribot, J.L., 2001c. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev. Iberoam. Micol.* 18, 163-170.

Ramage, G., Vande Walle, K., Wickes, B.L., López-Ribot, J.L., 2001d. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2475-2479.

Ramage, G., Saville, S.P., Wickes, B.L., López-Ribot, J.L., 2002a. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5459-5463.

Ramage, G., Vande Walle, K., Bachmann, S.P., Wickes, B.L., López-Ribot, J.L., 2002b. In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3634-3636.

Ramage, G., Bachmann, S.P., Patterson, T.F., Wickes, B.L., López-Ribot, J.L., 2002c. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 973-980.

Ramage, G., Vande Walle, K., López-Ribot, J.L., Wickes, B.L., 2002d. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 95-100.

Ramalho, R., Cunha, J., Teixeira, P., Gibbs, P.A., 2001. Improved methods for the enumeration of heterotrophic bacteria in bottled mineral waters. *J. Microbiol. Methods* 44, 97-103.

Rayner, J., Veeh, R., Flood, J., 2004. Prevalence of microbial biofilms on selected fresh produce and household surfaces. *Int. J. Food Microbiol.* 95, 29-39.

Read, R.R., Eberwein, P., Dasgupta, M.K., Grant, S.K., Lam, K., Nickel, J.C., Costerton, J.W., 1989. Peritonitis in peritoneal dialysis: bacterial colonization by biofilm spread along the catheter surface. *Kidney Int.* 35, 614-621.

Rice, S.A., McDougald, D., Kumar, N., Kjelleberg, S., 2005. The use of quorum-sensing blockers as therapeutic agents for the control of biofilm-associated infections. *Curr. Opin. Invest. Drugs* 6, 178-184.

Rickard, A.H., Leach, S.A., Buswell, C.M., High, N.J., Handley, P.S., 2000. Coaggregation between aquatic bacteria is mediated by specific-growth-phase-dependent lectin-saccharide interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 431-434.

Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Høiby, N., Givskov, M., Molin, S., Eberl, L., 2001. N-Acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiol.* 147, 3249-3262.

Rios, J.L., Recio, M.C., 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharm.* 22, 80-84.

Roccaro, A. S., Blanco, A.R., Giuliano, F., Rusciano, D., Enea, V., 2004. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1968-1973.

Rodríguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M., Díaz-Guerra, T.M., Mellado, E., 2001. Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2513-2517.

Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., Glasebrook, A.L., 1991. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods* 142, 257-265.

Rogers, J.D., Palmer, R.J., Kolenbrander, P.E., Scannapieco, F.A., 2001. Role of *Streptococcus gordonii* amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. *Infect. Immun.* 69, 7046-7056.

Rosan, B., Lamont, R.J., 2000. Dental plaque formation. *Microb. Infect.* 2, 1599-1607.

Rozen, R., Bachrach, G., Zachs, B., Steinberg, D., 2001. Growth rate and biofilm thickness of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans* on hydroxyapatite. APMIS 109, 155-160.

Ruhnke, M., 2002. Skin and mucuous membrane infections. In: Calderone, R.A. (Ed.), *Candida* and Candidiasis. ASM Press, Washington DC, USA, pp. 307-326.

Ryder, N.S., Wagner, S., Leitner, I., 1998. In vitro activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. Antimicrob. Agents Chemother. 42, 1057-1061.

S

Samaranayake, Y.H., Ye, J., Yau, J.Y.Y., Cheung, B.P.K., Samaranayake, L.P., 2005. In vitro method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. J. Clin. Microbiol. 43, 818-825.

Sammons, R., 2003. Control of dental plaque. In: Jass, J., Surman, S., Walker, J. (Eds), Medical biofilms: detection, prevention and control. Wiley, Chichester, UK, pp. 221-247.

Sanglard, D., Ischer, F., Calabrese, D., Majcherczyk, P.A., Bille, J., 1999. The ATP binding cassette transporter gene *CgCDR1* from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 2753-2765.

Sanglard, D., 2002. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 20, 462-470.

San-Millán, R., Ribacoba, L., Pontón, J., Quindós, G., 1996. Evaluation of a commercial medium for identification of *Candida* species. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15, 153-158.

Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J. Bacteriol. 184, 1140-1154.

Sbordone, L., Bortolaia, C., 2003. Oral microbial biofilms and plaque related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. Clin. Oral Invest. 7, 181-188.

-
- Schembri, M.A., Hjerrild, L., Gjermansen, M., Klemm, P., 2003. Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. J. Bacteriol. 185, 2236-2242.
- Schermers, F.H., Duffus, J.H., MacLeod, A.M., 1976. Studies on yeast esterase. J. Inst. Brew. 82, 170-174.
- Schierholz, J.M., Pulverer, G., 1998. Investigation of a rifampin, fusidic-acid and mupirocin releasing silicone catheter. Biomaterials 19, 2065-2074.
- Schierholz, J.M., Lucas, L.J., Rump, A., Pulverer, G., 1998. Efficacy of silver-coated medical devices. J. Hosp. Infect. 40, 257-262.
- Schierholz, J.M., Fleck, C., Beuth, J., Pulverer, G., 2000. The antimicrobial efficacy of a new central venous catheter with long-term broad-spectrum activity. J. Antimicrob. Chemoth. 46, 45-50.
- Schierholz, J.M., Yücel, N., Rump, A.F.E., Beuth, J., Pulverer, G., 2002. Antiinfective and encrustation-inhibiting materials – myths and facts. Int. J. Antimicrob. Agents. 19, 511-516.
- Schilling, K.M., Bowen, W.H., 1992. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 60, 284-295.
- Schmidt, J.E., Ahring, B.K., 1999. Immobilization patterns and dynamics of acetate-utilizing methanogens immobilized in sterile granular sludge in upflow anaerobic sludge blanket reactors. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1050-1054.
- Schwandt, L.Q., van Weissenbruch, R., Stokroos, I, van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Albers, F.W.J., 2004. Prevention of biofilm formation by dairy products and N-acetylcysteine on voice prostheses in an artificial throat. Acta Otolaryngol. 124, 726-731.
- Shapiro, J.A., 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. Annu. Rev. Microbiol. 52, 81-104.
- Smith, K.M., Bu, Y.G., Suga, H., 2003. Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. Chem. Biol. 10, 81-89.

- Smith, R.S., Iglewski, B.H., 2003. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. J. Clin. Invest. 112, 1460-1465.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G., 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 2. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, pp. 1043-1061.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., 2000. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol. 2000 28, 12-55.
- Söderström, B.E., 1977. Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. Soil Biol. Biochem, 9, 59-63.
- Sofer, D., Gilboa-Garber, N., Belz, A., Garber, N.C., 1999. 'Subinhibitory' erythromycin represses production of *Pseudomonas aeruginosa* lectins, autoinducer and virulence factors. Chemotherapy 45, 335-341.
- Sottile, F.D., Marrie, T.J., Prough, D.S., Hobgood, C.D., Gower, D.J., Webb, L.X., Costerton, J.W., Gristina, A.G., 1986. Nosocomial pulmonary infection: possible etiologic significance of bacterial adhesion to endotracheal tubes. Crit. Care Med. 14, 265-270.
- Spencer, R.C., 1999. Novel methods for the prevention of infection of intravascular devices. J. Hosp. Infect. 43, 127-135.
- Spoering, A.L., Lewis, K., 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. J. Bacteriol. 183, 6746-6751.
- Spratt, D., 2003. Dental plaque and bacterial colonization. In: Jass., J. Surman, S., Walker, J. (Eds), Medical biofilms, Detection, Prevention and Control. Wiley, Chichester, UK, pp. 175-198.
- Starkey, M., Gray, K.A., Chang, S.I., Parsek, M.R., 2004. A sticky business: the extracellular polymeric substance matrix of bacterial biofilms. In: Ghannoum, M.A., O'Toole, G.A. (Eds), Microbial biofilms. ASM Press, Washington DC, USA, pp. 174-191.
- Steidle, A., Sigl, K., Schuhegger, R., Ihring, A., Schmid, M., Gantner, S., Stoffels, M., Riedel, K., Givskov, M., Hartmann, A., Langebartels, C., Eberl, L., 2001. Visualisation of N-acylhomoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5761-5770.

Steinberg, D., Eyal, S., 2002. Early formation of *Streptococcus sobrinus* biofilms on various dental restorative materials. J. Dent. Res. 30, 47-51.

Steinberg, D., Beeman, D., Bowen, W.H., 1992. The effect of delmopinol on glucosyltransferase absorbed on to saliva-coated hydroxyapatite. Arch. Oral Biol. 37, 33-38.

Stewart, P.S., 1998. A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. Biotechnol. Bioeng. 59, 261-272.

Stewart, P.S., Grab, L., Diemer, J.A., 1998. Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system. J. Appl. Microbiol. 85, 495-500.

Stewart, P.S., Costerton, J.W., 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 358, 135-138.

Stewart, P.S., 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Int. J. Med. Microbiol. 292, 107-113.

Stewart, P.S., 2003. Diffusion in biofilms. J. Bacteriol. 185, 1485-1491.

Stewart, P.S., Mukherjee, P.K., Ghannoum, M.A., 2004. Biofilm antimicrobial resistance. In: Ghannoum, M.A., O'Toole, G.A. (Eds), Microbial Biofilms. ASM Press, Washington DC, USA, pp. 250-268.

Stickler, D.J., Morris, N.S., McLean, R.J.C., Fuqua, C., 1998. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3486-3490.

Stoodley, P., DeBeer, D., Lewandowski, Z. 1994. Liquid flow in biofilm systems. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2711-2716.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002. Biofilms as complex differentiated communities. Annu. Rev. Microbiol. 56, 187-209.

Stubbs, H.J., Brasch, D.J., Emerson, G.W., Sullivan, P.A., 1999. Hydrolase and transferase activities of the beta-1,3-exoglucanase of *Candida albicans*. Eur. J. Biochem. 263, 889-895.

Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion document E. Dis.7.1., in press, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen, Germany.

Sullivan, D.J., Westerneng, T.J., Haynes, K.A., Bennet, D.E., Coleman, D.C., 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV- infected individuals. Microbiol. 141, 1507-1521.

Sullivan, A., Wretling, B., Nord, C.E., 2003. Will triclosan in toothpaste select for resistant oral streptococci? Clin. Microbiol. Infect. 9, 306-309.

Sutherland, I.W., Kennedy, L., 1996. Polysaccharide lyases from gellan-producing *Sphingomonas* spp. Microbiol. 142, 867-872.

Swisher, R., Carroll, G.C., 1980. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. Microb. Ecol. 6, 217-226.

Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., Schleifer, K.-H., 2000. Microbiological safety of drinking water. Annu. Rev. Microbiol. 54, 81-127.

T

Tack, K.J., Sabath, L.D., 1985. Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiosis for tobramycin, gentamycin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin. Chemotherapy 31, 204-210.

Tang, G., Yip, H.-K., Cutress, T.W., Samaranayake, L.P., 2003. Artificial mouth systems and their contribution to caries research: a review. J. Dent. 31, 161-171.

Tay, J.-H., Tay, S.T.-L., Ivanov, V., Pan, S., Jiang, H.-L., Liu, Q.-S., 2003. Biomass and porosity profiles in microbial granules used for aerobic wastewater treatment. Lett. Appl. Microbiol. 36, 297-301.

-
- Teitzel, G.M., Parsek, M.R., 2003. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2313-2320.
- Tellier, R., Kraiden, M., Grigoriev, G.A., Campbell, I., 1992. Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. Antimicrob. Agents Chemother. 36, 1619-1625.
- Terzieva, S., Donnelly, J., Vidmantas, U., Grinshpun, S.A., Willeke, K., Stelma, G.N., Brenner, K.P., 1996. Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement. Appl. Environ. Microbiol. 62, 2264-2272.
- Thom, S.M., Horobin, R.W., Seidler, E., Barer, M.R., 1993. Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. J. Appl. Bacteriol. 74, 433-443.
- Thomas, J.G., Ramage, G., López-Ribot, J.L., 2004. Biofilms and implant infections. In: Ghannoum, M.A., O'Toole, G.A. (Eds), Microbial Biofilms. ASM Press, Washington DC, USA, pp. 269-293.
- Thormann, K.M., Saville, R.M., Shukla, S., Spormann, A.M., 2005. Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. J. Bacteriol. 187, 1014-1021.
- Trahan, L., 1995. Xylitol, a review of its action on mutans streptococci and dental plaque – its clinical significance. Int. Dent. J. 45, 77-92.
- Trautner, B.W., Darouiche, R.O., 2004. Catheter-associated infections. Arch. Intern. Med. 164, 842-850.
- Tsuchiya, H., 1999. Effects of green tea catechins on membrane fluidity. Pharm. 59, 34-44.
- Tsukamoto, I., Constaninoiu, E., Furata, M., Nishimura, R. Maeda, Y., 2004. Inactivation effect of sonication and chlorination on *Saccharomyces cerevisiae*. Calorimetric analysis. Ultrason. Sonochem. 11, 167-172.
- Tsuneda, S., Park, S., Hayashi, H., Jung, J., Hirata, A., 2001. Enhancement of nitrifying biofilm formation using selected EPS produced by heterotrophic bacteria. Water Sci. Technol. 43, 197-204.

Tuomanen, E., Cozens, R., Tosch, W., Zak, O., Tomasz, A., 1986. The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. J. Gen. Microbiol. 132, 1297-1304.

V

Vacca-Smith, A.M., Bowen, W.H., 1998. Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. Arch. Oral Biol. 43, 103-110.

van der Mei, H.C., Free, R.H., Elving, G.J., van Weissenbruch, R., Albers, F.W.J., Busscher, H.J., 2000. Effect of probiotic bacteria on prevalence of yeasts in oropharyngeal biofilms on silicone rubber voice prostheses in vitro. J. Med. Microbiol. 49, 713-718.

Van Weissenbruch, R., Bouckaert, S., Remon, J.-P., Nelis, H.J., Aerts, R., Albers, F.W.J., 1997. Chemoprophylaxis of fungal deterioration of the PROVOX silicone tracheoesophageal prosthesis in postlaryngectomy patients. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 106, 329-337.

Veiga, M.C., Mahendra, K.J., Wu, W.-M., Hollingsworth, R.I., Zeikus, J.G., 1997. Composition and role of extracellular polymers in methanogenic granules. Appl. Environ. Microbiol. 63, 403-407.

Verweij, P.E., Breuker, I.M., Rijs, A.J.M.M., Meis, J.F.G.M., 1999. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. J. Clin. Pathol. 52, 271-273.

Videla, H.A., 2002. Prevention and control of biocorrosion. Int. Biodeterior. Biodegrad. 49, 259-270.

Virta, M., Lineri, S., Kankaanpää, P., Karp, M., Peltonen, K., Nuutila, J., Lilius, E.-M. 1998. Determination of complement-mediated killing of bacteria by viability staining and bioluminescence. Appl. Environ. Microbiol. 64, 515-519.

Visser, M.J.T., van Lennep, A.C.D., van Bockel, J.H., van Hinsbergh, V.W.M., Slats, J., Tanke, H.J., 1994. A new, automated and accurate in vitro method to quantify endothelial cells attached to vascular prostheses. F. K. Schattaur Verlagsgesellschaft mbH (Stuttgart) 72, 146-150.

Vollertsen, J., Jahn, A., Nielsen, J.L., Hvitved-Jacobsen, T., Nielsen, P.H., 2001. Comparison of methods for the determination of microbial biomass in wastewater. *Water Res.* 35, 1649-1658.

W

Webb, J.S., Givskov, M., Kjelleberg, S., 2003a. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 578-585.

Webb, J.S., Thompson, L.S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., Kjelleberg, S., 2003b. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* 185, 4585-4592.

Wen, Z.T., Burne, R.A., 2002. Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1196-1203.

Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Heydorn, A., Molin, S., Pitts, B., Stewart, P.S., 2004. Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6188-6196.

Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Raps, P.C., Mattick, J.S., 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487.

White, T.C., Marr, K.A., Bowden, R.A., 1998. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 382-402.

White, T.C., Holleman, S., Dy, F., Mirels, L.F., Stevens, D.A., 2002. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1704-1713.

Wiencek, K.M., Fletcher, M., 1995. Bacterial adhesion to hydroxyl- and methyl- terminated alkanethiol self- assembled monolayers. *J. Bacteriol.* 177, 1959-1966.

Willinger, B., Manafi, M., 1999. Evaluation of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. *Mycoses.* 42, 61-65.

Wilson, M., 1996. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. J. Med. Microbiol. 44, 79-87.

Wilson, P., Stewart, A., Flournoy, V., Zito, S.W., Vancura, A., 2001. Liquid chromatographic determination of nystatin in pharmaceutical preparations. J. AOAC Int. 84, 1050-1055.

Wright, W.G., Thelwell, C., Svensson, B., Russell, R.R.B., 2002. Inhibition of catalytic and glucan-binding activities of a streptococcal GTF forming insoluble glucans. Caries Res. 36, 353-359.

Wunder, D., Bowen, W.H., 1999. Action of agents on glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* in solution and absorbed to experimental pellicle. Arch. Oral Biol. 44, 203-214.

Wu-Yuan, C.D., Chen, C.Y., Wu, R.T., 1988. Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis, and aggregation of mutans streptococci. J. Dent. Res. 67, 51-55.

Wu-Yuan, C.D., Green, L., Birch, W.X., 1990. In vitro screening of chinese medicinal toothpastes: their effects on growth and plaque formation of mutans streptococci. Caries Res. 24, 198-202.

Y

Yamashita, Y., Bowen, W.H., Burne, R.A., Kuramitsu, H.K., 1993. Role of the *Streptococcus mutans gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. Infect. Immun. 61, 3811-3817.

Yanagida, A., Kanda, T., Tanabe, M., Matsudaira, F., Oliveira Cordeiro, J.G., 2000. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of mutans streptococci. J. Agric. Food. Chem. 48, 5666-5671.

Yasuda, H., Ajiki, Y., Koga, T., Kawada, H., Yokota, T., 1993. Interaction between biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and clarithromycin. Antimicrob. Agents Chemother. 37, 1749-1755.

Yildiz, F.H., Schoolnik, G.K., 1999. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4028-4033.

Z

Zhang, L.-H., Dong, Y.-H., 2004. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol. Microbiol.* 53, 1563-1571.

Zhang, T., Fang, H.H.P., 2004. Quantification of *Saccharomyces cerevisiae* viability using *BacLight*. *Biotechnol. Lett.* 26, 989-992.

Zhang, T.C., Bishop, P.L., 1996. Evaluation of substrate and pH effects in a nitrifying biofilm. *Wat. Environ. Res.* 68, 1107-1115.

Zhang, X.Q., Bishop, P.L., Kinkle, B.K., 1999. Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Water Sci. Technol.* 39, 211-218.

Zhu, M., Takenaka, S., Sato, M., Hoshino, E., 2001. Influence of starvation and biofilm formation on acid resistance of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.* 16, 24-27.

Zobell, C.E., 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.* 46, 39-56.

